

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
FACULTAD DE VETERINARIA  
Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los  
Alimentos



**TESIS DOCTORAL**

**Caracterización, diseño y producción recombinante de  
bacteriocinas y otros péptidos antimicrobianos, secuenciación  
genómica y efecto en la microbiota de péptidos bioactivos  
producidos por enterococos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Sara Arbulu Ruiz**

Directores

**Pablo E. Hernández Cruza**

**Carmen Herranz Sorribes**

**Luis Cintas Izarra**

**Madrid, 2017**

**Universidad Complutense Madrid**  
**Facultad de Veterinaria**  
**Departamento de Nutrición, Bromatología**  
**y Tecnología de los Alimentos**

**CARACTERIZACIÓN, DISEÑO Y PRODUCCIÓN  
RECOMBINANTE DE BACTERIOCINAS Y OTROS  
PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS, SECUENCIACIÓN  
GENÓMICA Y EFECTO EN LA MICROBIOTA DE  
PÉPTIDOS BIOACTIVOS PRODUCIDOS POR  
ENTEROCOCOS**



**TESIS DOCTORAL**

**SARA ARBULU RUIZ**

**DIRECTORES:**

**PABLO E. HERNÁNDEZ CRUZA**  
**CARMEN HERRANZ SORRIBES**  
**LUIS M. CINTAS IZARRA**

**Madrid, 2016**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA  
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**CARACTERIZACIÓN, DISEÑO Y PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE  
BACTERIOCINAS Y OTROS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS,  
SECUENCIACIÓN GENÓMICA Y EFECTO EN LA MICROBIOTA DE  
PÉPTIDOS BIOACTIVOS PRODUCIDOS POR ENTEROCOCOS**

**TESIS DOCTORAL**

**SARA ARBULU RUIZ**

**DIRECTORES:**

**PABLO E. HERNÁNDEZ CRUZA  
CARMEN HERRANZ SORRIBES  
LUIS M. CINTAS IZARRA**

**Madrid, 2016**





**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA  
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**CARACTERIZACIÓN, DISEÑO Y PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE  
BACTERIOCINAS Y OTROS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS,  
SECUENCIACIÓN GENÓMICA Y EFECTO EN LA MICROBIOTA DE  
PÉPTIDOS BIOACTIVOS PRODUCIDOS POR ENTEROCOCOS**

Memoria que, para optar al título de Doctor con mención honorífica de  
“Doctorado Europeo”, presenta la Licenciada y Máster  
Sara Arbulu Ruiz

Madrid, junio de 2016





Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología  
de los Alimentos  
Facultad de Veterinaria

Ciudad Universitaria, s/n. 28040 Madrid  
Teléfono: 91-394 3749. Fax: 91-394 3743

**PABLO E. HERNÁNDEZ CRUZA, CARMEN HERRANZ SORRIBES Y LUIS M. CINTAS IZARRA, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA, PROFESORA CONTRATADA DOCTORA Y PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD, RESPECTIVAMENTE, DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID (UCM),**

**CERTIFICAN:**

Que, la Tesis Doctoral titulada **“Caracterización, diseño y producción recombinante de bacteriocinas y otros péptidos antimicrobianos, secuenciación genómica y efecto en la microbiota de péptidos bioactivos producidos por enterococos”**, de la que es autora la Licenciada en Farmacia y Máster en Microbiología Avanzada Dña. Sara Arbulu Ruiz, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la UCM, bajo la dirección conjunta de los que suscriben, y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor por la UCM con mención honorífica de “Doctorado Europeo”.

Madrid, a 20 de junio de 2016

Los Directores de la Tesis Doctoral,

Pablo E. Hernández Cruza

Carmen Herranz Sorribes

Luis M. Cintas Izarra



A mis padres,

En memoria de mis abuelos,



La defensa de esta tesis doctoral supone el fin de una etapa de aprendizaje y superación que no hubiese sido posible sin todos aquellos que he conocido y con los que he tenido la oportunidad de trabajar y aprender a lo largo de estos años.

Gracias al Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos por acogerme durante la realización de este trabajo investigador, por su ayuda y por la amabilidad recibida.

A mis directores de tesis Pablo Hernández, Carmen Herranz y Luis Cintas, gracias por acogerme en vuestro grupo de investigación, por vuestra ayuda, dedicación y esfuerzo a lo largo de estos años para que este trabajo saliera adelante. Me habéis enseñado que la incertidumbre y la frustración que muchas veces conlleva la investigación se vencen con curiosidad y ganas de aprender, además de con una buena dosis de trabajo y perseverancia.

A todos mis compañeros de laboratorio, gracias por recibirme con los brazos abiertos, por vuestra complicidad, vuestra ayuda y por las charlas y risas entre pipeteo y pipeteo.

Cristina, gracias por tu generosidad y cercanía y por las inquietudes compartidas a primera hora desde el otro lado de la poyata. Juanjo, tu buen humor y positivismo son contagiosos y muy necesarios; gracias por hacerme sentir como en casa durante mis visitas a Ås. Loreto, contigo aprendí a clonar y a hacer muchísimas cosas en el lab, también a ser más pragmática, gracias por todo ello; Alicia, gracias por tu compañerismo y buenos consejos. De Nicolette e Inés no olvidaré su forma de disfrutar y vuestras charletas durante las comidas.

Silvia, Estefanía, Carlos, ¡qué hubiese hecho este tiempo sin vosotros! Silvia, eres una fuente inagotable de ideas y de entusiasmo por conocer, aprender y descubrir. Estefanía, de tí me llevo tu tenacidad y afán por el trabajo bien hecho. Carlos, me encanta tu entusiasmo emprendedor y tu vitalidad para iniciar cada proyecto y cada nueva etapa. Gracias a vosotros por tantos buenos ratos, reflexiones y paseítos.

Gracias por la ayuda y generosidad de aquéllos compañeros con los que he coincidido menos tiempo como Juan, Bea, Miguel, Idoia, Raquel y Aina. Gracias a los compañeros del laboratorio de al lado por vuestra ayuda siempre. Gracias también al resto de profesores y personal de administración y servicios de este Departamento porque siempre me ayudasteis cuando lo necesité.

Gracias también al Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) por la concesión de una Beca Predoctoral (BES-2010-031906) de Formación del Personal Investigador (FPI), así como las Ayudas para Estancias Investigadoras Cortas en la Norwegian University of Life Sciences, Ås (Norway) y en la University of Alberta, Edmonton (Canada). La concesión del EEA grant NILS Science and Sustainability Coordinated Mobility of Researchers (017-ABEL-CM-2013), también ha facilitado la realización de otras estancias investigadoras cortas en la Norwegian University of Life Sciences, Ås (Norway). Asimismo, el trabajo investigador realizado ha sido posible gracias a los fondos recibidos de los proyectos S2009/AGR-1489 y

S2013/ABI-2747 de la Comunidad de Madrid (CAM), del Banco Santander Central Hispano - Universidad Complutense de Madrid (BSH-UCM, Proyectos GR35-10A y GR3/14), del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, proyecto AGL2009-08348) y del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO, proyecto AGL2012-34829).

A la Dra. Rosa del Campo, del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid, gracias por tu ayuda durante la realización de este trabajo y por la simpatía y buena disposición con la que siempre nos acoges.

I would also like to acknowledge the help from Professors Ingolf Nes, Dzung Diep and Knut Rudi from the Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science (IKBM), Norwegian University of Life Sciences (NMBU), Ås (Norway), from Professor John Vederas from the Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton (Canada), and from most researchers in their teams. Many thanks for giving to me the opportunity to work in your labs. Thanks for your help and supervision. Special thanks to Christopher Lohans for his valuable expertise, time and patience introducing me in the ins and outs of NMR.

I can't forget all the people I met in Ås and Edmonton. Thanks for your warm welcome, for the hiking trips, dinners and funny dances in cold far-off lands.

A mi Equipo piso, mil gracias por tantos momentos; siempre guardaré muy buen recuerdo de esta etapa con vosotros en Madrid (y de las paellas domingueras).

A mis amigos de siempre y a mis farmacéuticas favoritas, gracias por preguntarme cómo iba la tesis y, a veces, por no preguntar, por escuchar, por animarme y porque siempre sois una inyección de perspectiva y energía positiva.

A mi familia, a mis padres gracias por quererme, cuidarme y ayudarme tanto, por empujarme siempre hacia adelante y por vuestro apoyo y ejemplo constantes.

A todos, ¡gracias!





**ÍNDICE**

---

**TABLE OF CONTENTS**



<b>RESUMEN.....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>6</b>
 <b>CAPÍTULO I / CHAPTER I</b>	
<b>EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR: OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
<b>GENERAL ACCOUNTS OF THE RESEARCH PROBLEM: OBJECTIVES.....</b>	<b>14</b>
 <b>CAPÍTULO II</b>	
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>II.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y CONSIDERACIONES TAXONÓMICAS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS.....</b>	<b>19</b>
<b>II.1.1. LAS BACTERIAS LÁCTICAS COMO PROBIÓTICOS.....</b>	<b>20</b>
II.1.1.1. Definición y principales características de los probióticos.....	20
II.1.1.2. Evaluación de la seguridad de los probióticos.....	20
II.1.1.3. Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas.....	23
<b>II.1.2. EL GÉNERO <i>ENTEROCOCCUS</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>II.2. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE SÍNTESIS RIBOSOMAL.....</b>	<b>26</b>
<b>II.2.1. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS PRODUCIDOS POR PROCARIOTAS.....</b>	<b>27</b>
II.2.1.1. Bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas.....	28
II.2.1.1.1. Microcina V/Colicina V.....	29
II.2.1.2. Bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas: bacteriocinas producidas por bacterias lácticas (BAL).....	30
II.2.1.2.1. Clasificación.....	30
II.2.1.2.2. Bacteriocinas de la clase IIa.....	32
II.2.1.2.3. Características estructurales de las bacteriocinas de la clase IIa...	33
II.2.1.2.4. Organización genética, biosíntesis y regulación de bacteriocinas a de la clase IIa.....	35
II.2.1.2.4.1. Genes estructurales.....	35
II.2.1.2.4.2. Inmunidad.....	36
II.2.1.2.4.3. Transporte y procesamiento.....	37
II.2.1.2.5. Mecanismo de acción y espectro antimicrobiano.....	39
II.2.1.2.5.1. Resistencias.....	42
<b>II.2.2. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS PRODUCIDOS POR EUCARIOTAS.....</b>	<b>42</b>
II.2.2.1. Defensinas.....	44
II.2.2.2. Catelicidinas.....	45
II.2.2.3. Pleurocidinas: pleurocidina de platija.....	46
<b>II.2.3. Aplicaciones de los péptidos antimicrobianos.....</b>	<b>46</b>
II.2.3.1. Aplicaciones de las bacteriocinas, microcinas y colicinas.....	47
II.2.3.2. Aplicaciones de los péptidos antimicrobianos producidos por eucariotas.....	49
II.2.4. Diseño de genes sintéticos que codifican la síntesis de bacteriocinas.....	50
<b>II.3. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS Y OTROS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS.....</b>	<b>50</b>

II.3.1. Producción heteróloga de proteínas por levaduras.....	51
II.3.2. Levaduras metilotrofas: <i>Pichia pastoris</i> .....	52
II.3.3. El género <i>Pichia</i> ( <i>Komagataella</i> ).....	52
II.3.4. Promotor de la enzima alcohol oxidasa (PAOX1).....	53
II.3.5. Vectores de expresión proteica para <i>P. pastoris</i> .....	54
II.3.6. Estrategias de integración y fenotipo Mut (del inglés, <i>methanol utilisation</i> ) de <i>P. pastoris</i> .....	56
II.3.7. Metabolismo del metanol en <i>P. pastoris</i> .....	57
II.3.8. Secreción de proteínas.....	58
II.3.9. Factores que afectan a la producción heteróloga de proteínas y péptidos por <i>P. pastoris</i> .....	59
II.3.10. Péptidos antimicrobianos producidos por levaduras.....	59
II. 4. EL BUITRE LEONADO ( <i>Gyps fulvus</i> subespecie <i>fulvus</i> ).....	64
II.4.1. Biología del buitre leonado.....	64
<i>Hábitat</i> .....	65
<i>Población</i> .....	65
<i>Reproducción</i> .....	65
<i>Alimentación</i> .....	66
II.4.2. ¿Por qué los buitres?.....	66
II.5. SECUENCIACIÓN MASIVA DE ACIDOS NUCLEICOS.....	67
II.5.1. Plataformas Illumina (Solexa) GA/HiSeq/MiSeq/NextSeq.....	69
II.5.2. Análisis bioinformático.....	69
II.5.3. Aplicaciones de las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos de nueva generación (NGS).....	70

### CAPÍTULO III / CHAPTER III

#### ACTIVIDAD BACTERIOCINOGÉNICA, SEGURIDAD Y POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTERIAS LÁCTICAS (BAL) AISLADAS DE HECES DE BUITRES LEONADOS (*Gyps fulvus* subesp. *fulvus*)

<b>BACTERIOCINOGENIC ACTIVITY, SAFETY ASPECTS AND BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF FECAL LACTIC ACID BACTERIA (LAB), ISOLATED FROM GRIFFON VULTURES (<i>Gyps fulvus</i> subsp. <i>fulvus</i>)</b> .....	73
<b>ABSTRACT</b> .....	75
<b>BACKGROUND</b> .....	76
<b>METHODS</b> .....	77
<i>Microbiological analysis, indicator strains and bacteriocinogenic assays</i> .....	77
<i>PCR analysis, DNA sequencing and other DNA manipulations</i> .....	78
<i>Genus and species identification, and detection of bacteriocin structural genes and potential virulence factors</i> .....	78
<i>Safety assessment of <i>E. faecium</i> M3K31</i> .....	79
<i>Production of gelatinase, caseinolytic and hemolytic activity, and antibiotic susceptibility testing</i> .....	79

<i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences (ERIC-PCR) and multilocus sequence typing .....</i>	80
<i>Purification of bacteriocins.....</i>	80
<i>Mass spectrometry analysis and amino acid sequencing.....</i>	80
<b>RESULTS.....</b>	81
<i>Identification of the isolates with antimicrobial activity.....</i>	81
<i>Evaluation of bacteriocin structural genes.....</i>	82
<i>Potential virulence factors, antibiotic susceptibility and hemolytic activity.....</i>	82
<i>Safety assessment of E. faecium M3K31.....</i>	83
<i>Molecular genotyping of selected enterococcal strains by ERIC-PCR and MLST analysis.....</i>	83
<i>Purification of bacteriocin, mass spectrometry analysis and amino acid sequencing.....</i>	83
<i>Antimicrobial activity of purified enterocin A (EntA) and enterocin HF (EntHF) against Listeria spp.....</i>	84
<b>DISCUSSION.....</b>	84
<b>CONCLUSIONS.....</b>	88
<b>REFERENCES.....</b>	90
<b>TABLES AND FIGURES.....</b>	96

## **CAPÍTULO IV / CHAPTER IV**

### **CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES SINTÉTICOS QUE CODIFICAN LAS BACTERIOCINAS DE AMPLIO ESPECTRO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA SRCAM 602, OR-7, E-760 Y L-1077, POR *Pichia pastoris***

<b>CLONING AND EXPRESSION OF SYNTHETIC GENES ENCODING THE BROAD ANTIMICROBIAL SPECTRUM BACTERIOCINS SRCAM 602, OR-7, E-760, AND L-1077, BY RECOMBINANT <i>Pichia pastoris</i>.....</b>	115
<b>ABSTRACT.....</b>	117
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	118
<b>2. MATERIALS AND METHODS.....</b>	118
2.1. Microbial strains and plasmids.....	118
2.2. Basic genetic techniques and enzymes.....	118
2.3. PCR amplification and nucleotide sequencing.....	118
2.4. Cloning of the srcam602, or-7, e-760, and l-1077 synthetic genes in <i>P. pastoris</i> X-33 and antimicrobial activity of the transformants.....	118
2.5. Purification of the antimicrobial activity of supernatants from the recombinant yeasts	121
2.6. Mass spectrometry analysis of purified supernatants.....	121
2.7. Antimicrobial activity of purified supernatants from the recombinant yeasts.....	121
<b>3. RESULTS.....</b>	121
3.1. Cloning of the synthetic genes encoding bacteriocins and their expression by recombinant <i>P. pastoris</i> .....	121
3.2. Purification of the antimicrobial activity of supernatants from the recombinant <i>P. pastoris</i> and mass spectrometry analysis.....	121

3.3. Antimicrobial activity of purified supernatants from the recombinant yeasts.....	122
4. DISCUSSION.....	122
REFERENCES.....	125
 <b>CAPÍTULO V / CHAPTER V</b>	
<b>ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL EN SOLUCIÓN DE LA ENTEROCINA HF, UNA BACTERIOCINA CON ELEVADA ACTIVIDAD ANTILISTERIANA PRODUCIDA POR <i>Enterococcus faecium</i> M3K31</b>	
<b><i>SOLUTION STRUCTURE OF ENTEROCIN HF, AN ANTILISTERIAL BACTERIOCIN PRODUCED BY <i>Enterococcus faecium</i> M3K31</i></b> .....	129
ABSTRACT.....	131
INTRODUCTION.....	131
MATERIALS AND METHODS.....	132
Purification of enterocin HF.....	132
Circular dichroism (CD) spectroscopy.....	132
NMR spectroscopy.....	132
Structure calculations.....	132
Data bank accession numbers.....	132
RESULTS.....	132
DISCUSSION.....	133
REFERENCES.....	135
SUPPORTING INFORMATION.....	138
 <b>CAPÍTULO VI / CHAPTER VI</b>	
<b>DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA GENÓMICA DE <i>Enterococcus faecium</i> M3K31, PRODUCTORA DE BACTERIOCINAS Y AISLADA DE BUITRES LEONADOS (<i>Gyps fulvus</i> subsp. <i>fulvus</i>)</b>	
<b><i>DRAFT GENOME SEQUENCE OF THE BACTERIOCIN-PRODUCING STRAIN <i>Enterococcus faecium</i> M3K31, ISOLATED FROM GRIFFON VULTURES (<i>Gyps fulvus</i> subsp. <i>fulvus</i>)</i></b> .....	143
 <b>CAPÍTULO VII / CHAPTER VII</b>	
<b>CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES SINTÉTICOS QUE CODIFICAN BACTERIOCINAS DE LA CLASE IIa NATIVAS, BACTERIOCINAS HÍBRIDAS Y BACTERIOCINAS QUIMERAS, POR <i>Pichia pastoris</i></b>	
<b><i>CLONING AND EXPRESSION OF SYNTHETIC GENES ENCODING NATIVE, HYBRID AND BACTERIOCIN-DERIVED CHIMERAS FROM MATURE CLASS IIA BACTERIOCINS, BY RECOMBINANT <i>Pichia pastoris</i></i></b> .....	147
VII.1. ABSTRACT.....	149
VII.2. INTRODUCTION.....	149
VII.3. MATERIALS AND METHODS.....	151

VII.3.1. Microbial strains and plasmids.....	151
VII.3.2. Basic genetic techniques and enzymes.....	151
VII.3.3. PCR amplification and nucleotide sequencing.....	151
VII.3.4. Heterologous expression by <i>P. pastoris</i> .....	156
VII.3.4.1. Cloning of synthetic genes encoding native, hybrid and bacteriocin-derived chimeras in the pPICZαA protein expression.....	156
VII.3.4.2. Antimicrobial activity of recombinant <i>P. pastoris</i> X-33-derived producers...	157
VII.3.4.3. Purification of the antimicrobial activity of supernatants from recombinant <i>P. pastoris</i> X-33.....	157
VII.3.5 Cloning of the synthetic genes <i>entHF</i> and <i>entCRL35</i> in <i>P. pastoris</i> X-33, using the SUMOpro-3 <sup>®</sup> gene fusion technology.....	158
VII.3.5.1. Construction of the pP-ahSUMO3-EntHF and pP-ahSUMO3-EntCRL35....	158
VII.3.5.2. Expression and purification of hSUMO3 fused to EntHF and EntCRL35.....	163
VII.3.5.6. Mass spectrometry (MS) and multiple reaction monitoring (MRM) analysis of the purified peptide fractions from supernatants of recombinant <i>P.</i> <i>pastoris</i> X-33.....	164
VII.3.5.7. Antimicrobial activity of the chemically synthesized EntP::EntHF.....	165
VII.3.5.8. Three-dimensional (3D) homology modeling.....	165
VII.4. RESULTS.....	166
VII.4.1. Cloning of synthetic genes encoding native, hybrid and bacteriocin-derived chimeras and their expression.....	166
VII.4.2. Production and purification of bacteriocins from supernatants of recombinant <i>P.</i> <i>pastoris</i> X-33 .....	166
VII.4.3. Mass spectrometry (MS) analysis and multiple reaction monitoring (MRM) analysis of the purified bacteriocin fractions.....	169
VII.4.4. Three-dimensional (3D) structures of bacteriocins predicted by homology modeling.....	172
VII.4.5. Antimicrobial activity of the synthetic EntP::EntHF <sub>synth</sub> peptide as compared to the EntP::EntHF chimera produced by <i>P. pastoris</i> X-33.....	172
VII.5. DISCUSSION.....	175
VII.6. AKNOWLEDGEMENTS.....	180
VII.7. REFERENCES.....	180

## CAPÍTULO VIII / CHAPTER VIII

### CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES SINTÉTICOS QUE CODIFICAN PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (PAMs) NATIVOS, PÉPTIDOS HÍBRIDOS Y BACTERIOCINAS-PAMs QUIMERAS, POR *Pichia pastoris*

CLONING AND EXPRESSION OF SYNTHETIC GENES ENCODING NATIVE ANTIMICROBIAL PEPTIDES (AMPS), HYBRID PEPTIDES AND BACTERIOCIN- AMPS-DERIVED CHIMERAS, BY RECOMBINANT <i>Pichia pastoris</i> .....	185
VIII.1. ABSTRACT.....	187
VIII.2. INTRODUCTION.....	187
VIII.3. MATERIALS AND METHODS.....	189



VIII.3.1. Microbial strains.....	189
VIII.3.2 Basic genetic techniques and enzymes.....	189
VIII.3.3. PCR amplification and oligonucleotide sequencing.....	193
VII.3.4. Cloning of synthetic genes encoding native, hybrid peptides and bacteriocin-AMPs-derived chimeras in the pPICZαA protein expression vector.....	193
VIII.3.5. Antimicrobial activity of the recombinant <i>P. pastoris</i> X-33-derived producers.....	197
VIII.3.6. Purification of the antimicrobial activity of supernatants from the recombinant yeasts.....	197
VIII.3.7. Mass spectrometry (MS) analysis of the purified peptide fractions.....	198
VIII.4. RESULTS AND DISCUSSION.....	198
VIII.5. REFERENCES.....	204

## CAPÍTULO IX / CHAPTER IX

### DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA GENÓMICA DE LA CEPA BACTERIOCINOGENICA DE *Enterococcus faecalis* DBH18, AISLADA DE ÁNADES REALES (*Anas platyrhynchos*)

<i>DRAFT GENOME SEQUENCE OF THE BACTERIOCINOGENIC STRAIN Enterococcus faecalis</i> DBH18, ISOLATED FROM MALLARD DUCKS ( <i>Anas platyrhynchos</i> ).....	209
--	-----

## CAPÍTULO X / CHAPTER X

### EFFECTO DE HIDROLIZADOS LÁCTEOS FERMENTADOS Y DE PÉPTIDOS ANTIHIPERTENSIVOS SINTÉTICOS EN LA MICROBIOTA FECAL HUMANA Y COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA

<i>EFFECT OF BOVINE MILK-DERIVED FERMENTED HYDROLYSATES AND CHEMICALLY-SYNTHESIZED ANTIHYPERTENSIVE PEPTIDES ON HUMAN FECAL MICROBIOTA AND SHORT CHAIN FATTY ACIDS COMPOSITION</i> .....	214
X.1. ABSTRACT.....	215
X.2. INTRODUCTION.....	215
X.3. MATERIALS AND METHODS.....	217
X.3.1. Obtention of milk-derived hydrolysates and antihypertensive peptides.....	217
X.3.2. Preparation of human fecal samples for batch cultures.....	217
X.3.3 Purification of fecal genomic DNA.....	218
X.3.4 Microbial community analysis by Illumina sequencing.....	218
X.3.5 Data analysis.....	219
X.3.6 Determination of short chain fatty acids (SCFAs).....	220
X.4. RESULTS.....	220
X.4.1 16S rRNA gene analysis and composition of the fecal microbiota.....	220
X.4.2 Diversity of the microbiota.....	224
X.4.3 Short chain fatty acids (SCFAs) composition.....	225
X.5. DISCUSSION.....	226
X.6. REFERENCES.....	229

## CAPÍTULO XI

<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>233</b>
<b>XI.1. ACTIVIDAD BACTERIOCINOGENICA, SEGURIDAD Y POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTERIAS LÁCTICAS (BAL) AISLADAS DE HECES DE BUITRES LEONADOS (<i>Gyps fulvus</i> subsp. <i>fulvus</i>).....</b>	<b>235</b>
<i>Resumen</i> .....	235
XI.1.1. Identificación de bacterias lácticas (BAL) con actividad antimicrobiana.....	236
XI.1.2. Identificación de genes estructurales responsables de la síntesis de bacteriocinas.....	237
XI.1.3. Determinación de la presencia de factores potenciales de virulencia, sensibilidad a antibióticos y actividad hemolítica.....	237
XI.1.4. Evaluación de la seguridad de <i>E. faecium</i> M3K31.....	238
XI.1.5. Genotipado molecular de los enterococos con actividad antimicrobiana mediante ERIC-PCR y MLST.....	238
XI.1.6. Purificación de bacteriocinas producidas por enterococos, espectrometría de masas y secuenciación aminoacídica.....	239
XI.1.7. Actividad antimicrobiana de la enterocina A (EntA) y enterocina HF (EntHF) purificadas a homogeneidad, frente a <i>Listeria</i> spp.....	240
<b>XI.2. Clonación y expresión de genes sintéticos que codifican las bacteriocinas de amplio espectro de actividad antimicrobiana SRCAM 602, OR-7, E-760 y L-1007, por <i>Pichia pastoris</i>.....</b>	<b>241</b>
<i>Resumen</i> .....	241
XI.2.1. Clonación de los genes sintéticos que codifican la síntesis de diversas bacteriocinas y evaluación de su expresión funcional por <i>P. pastoris</i> X-33.....	241
XI.2.2. Purificación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de las levaduras recombinantes, análisis por espectrometría de masas y determinación de su actividad antimicrobiana.....	242
<b>XI.3. Estructura tridimensional (3D) en solución de la enterocina HF, una bacteriocina con elevada actividad antilisteriana producida por <i>Enterococcus faecium</i> M3K31.....</b>	<b>244</b>
<i>Resumen</i> .....	244
XI.3.1. Purificación de la bacteriocina, dicroísmo circular (DC) y resonancia magnética nuclear ( <sup>1</sup> H-RMN).....	244
<b>XI.4. Determinación de la secuencia genómica de <i>Enterococcus faecium</i> M3K31, productora de bacteriocinas y aislada de buitres leonados (<i>Gyps fulvus</i> subesp. ....</b>	<b>248</b>
<b>XI.5. Clonación y expresión de genes sintéticos que codifican bacteriocinas de la clase IIa nativas, bacteriocinas híbridas y bacteriocinas quimeras, por <i>Pichia pastoris</i>.....</b>	<b>249</b>
<i>Resumen</i> .....	249
XI.5.1. Clonación y expresión funcional de genes sintéticos que codifican bacteriocinas nativas, bacteriocinas híbridas y bacteriocinas quimeras.....	250
XI.5.2. Producción y purificación de las bacteriocinas de los sobrenadantes de las cepas recombinantes de <i>P. pastoris</i> X-33.....	251

XI.5.3. Análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) y por monitorización de reacciones múltiples por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de ionización por electrospray [MRM-LC-ESI-MS/MS (QTRAP)], de las bacteriocinas purificadas.....	253
XI.5.4. Predicción de la estructura tridimensional (3D) de bacteriocinas híbridas y bacteriocinas quimeras mediante modelado por homología.....	255
XI.5.5. Comparación de la actividad antimicrobiana de la bacteriocina quimera EntP::EntHF sintética con la bacteriocina quimera EntP::EntHF recombinante, producida por <i>P. pastoris</i> .....	255
<b>XI.6. Clonación y expresión de genes sintéticos que codifican péptidos antimicrobianos (PAMs) nativos, péptidos híbridos y bacteriocinas-PAMs quimeras, por <i>Pichia pastoris</i>.....</b>	<b>256</b>
<i>Resumen</i> .....	256
XI.6.1. Clonación y expresión de péptidos antimicrobianos (PAMs) nativos, péptidos híbridos y bacteriocinas-PAMs quimeras, por <i>Pichia pastoris</i> .....	257
XI.6.2. Análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) de los péptidos antimicrobianos (PAMs) y péptidos híbridos purificados.....	258
<b>XI.7. Determinación de la secuencia genómica de la cepa bacteriocinogénica de <i>Enterococcus faecalis</i> DBH18, aislada de ánades reales (<i>Anas platyrhynchos</i>).....</b>	<b>259</b>
<b>XI.8. Efecto de hidrolizados lácteos fermentados y de péptidos antihipertensivos sintéticos en la microbiota fecal humana y composición de ácidos grasos de cadena corta (SCFA).....</b>	<b>260</b>
<i>Resumen</i> .....	260
XI.8.1. Análisis de amplicones que codifican el 16S rRNA y composición de la microbiota fecal humana.....	261
XI.8.2. Diversidad de la microbiota fecal humana.....	263
XI.8.3. Composición de ácidos grasos de las muestras fecales humanas.....	264
<b>CAPÍTULO XII / CHAPTER XII</b>	
<b>CONCLUSIONES</b> .....	267
<b>CONCLUSIONS</b> .....	272
<b>CAPÍTULO XIII</b>	
<b>TRABAJO FUTURO</b> .....	275
<b>CAPÍTULO XIV</b>	
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	281
<b>APÉNDICES</b> .....	319
<b>APÉNDICE 1. LISTADO DE ABREVIATURAS</b> .....	321
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS GENERALES.....	321
ABREVIATURAS DE UNIDADES.....	325

ABREVIATURAS DE GÉNEROS MICROBIANOS.....	325
ABREVIATURAS DE NUCLEÓTIDOS.....	325
ABREVIATURAS Y MASA MOLECULAR DE AMINOÁCIDOS.....	326
<b>APÉNDICE 2. CÓDIGO GENÉTICO.....</b>	<b>327</b>
<b>APÉNDICE 3. LISTADO DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y SECUENCIAS DIANA ESPECÍFICAS.....</b>	<b>327</b>
<b>APÉNDICE 4. LISTADO DE TABLAS.....</b>	<b>328</b>
<b>APÉNDICE 5. LISTADO DE FIGURAS.....</b>	<b>329</b>



**RESUMEN**

**SUMMARY**









El trabajo desarrollado en esta tesis doctoral ha empleado técnicas de microbiología y bioquímica clásicas, así como técnicas recientes de ingeniería genética, genómica y proteómica y describe en capítulos diferenciados, los siguientes objetivos:

En el capítulo III, se describe la identificación y caracterización de bacterias lácticas (BAL) aisladas de heces de buitres leonados (*Gyps fulvus* subesp. *fulvus*) por su actividad antimicrobiana, genes que codifican bacteriocinas, factores potenciales de virulencia, susceptibilidad a antibióticos, genotipado por las técnicas de ERIC-PCR y MLST y caracterización bioquímica de las bacteriocinas purificadas por MALDI-TOF MS, secuenciación aminoacídica N-terminal por degradación de Edman y secuenciación *de novo* de las bacteriocinas purificadas por MALDI TOF/TOF MS. De interés ha sido el aislamiento y caracterización de *E. faecium* M3K31, productor de la enterocina HF (EntHF) y de *E. faecalis* M3M42, que podría postularse como potencialmente productora de péptidos bioactivos.

En el capítulo IV, se describe la clonación y expresión de genes sintéticos que codifican las bacteriocinas de amplio espectro de acción SRCAM 602, OR-7, E-760 y L-1077, previamente descritas por su actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas incluyendo *Campylobacter* spp. y producidas por levaduras recombinantes, derivadas de *P. pastoris*. No obstante, las levaduras recombinantes no mostraron una actividad antimicrobiana directa y la potencialmente presente en los sobrenadantes de los cultivos productores, sólo pudo evaluarse mediante un procedimiento multicromatográfico de purificación. Sin embargo, el análisis de las fracciones purificadas por MALDI-TOF MS y MALDI TOF/TOF, reveló la presencia en las mismas de fragmentos peptídicos no relacionados con la masa molecular deducida de las bacteriocinas clonadas.

En el capítulo V, la utilización de técnicas de dicroísmo circular (CD) y de resonancia magnética nuclear (NMR) han permitido determinar la estructura tridimensional (3D) de la enterocina HF (EntHF), producida por *E. faecium* M3K31. La EntHF purificada se mostró desestructurada en agua pero adoptó una conformación hélice alfa con concentraciones crecientes de trifluoroetanol (TFE). Además, los resultados obtenidos sugieren que la bacteriocina adopta la forma de lámina beta antiparalela en su región N-terminal, seguida de una hélice alfa bien definida en la región central y de una región C-terminal más desestructurada. Todo ello sugiere que la EntHF posee tres dominios estructurales diferenciados que podrían actuar de manera coordinada y que su estructura (3D) en solución, se ajusta al conocimiento existente acerca del reconocimiento de receptores específicos y modo de acción de bacteriocinas de la clase IIa.

En el capítulo VI, la utilización de técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) y de la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq han permitido la secuenciación del genoma de *E. faecium* M3K31, productor de la EntHF. El ensamblaje de las secuencias obtenidas produjo un total de 2.722.557 pb, con un contenido de G+C del 38,1%. El análisis de las secuencias resultantes confirmó que *E. faecium* M3K31 codifica el gen estructural de la EntHF, los genes estructural y de inmunidad de la EntP y el gen estructural que codifica un

péptido 85% idéntico a la bacteriocina SRCAM 602, la ausencia de genes requeridos para su consideración por la EFSA como un probiótico seguro en alimentación animal, y la identificación de una repetición palindrómica corta agrupada y regularmente interespaciada de nucleótidos (CRISPR).

En el capítulo VII, se describe la clonación de genes sintéticos diseñados de (a), las bacteriocinas EntHF y enterocina CRL35 (EntCRL35), (b) de bacteriocinas híbridas derivadas de la fusión de la EntA consigo misma, con la EntHF y con la EntCRL35, y (c) de bacteriocinas quimeras derivadas de la fusión de la región N-terminal de la EntA y la EntP con la región C-terminal de la EntHF y la EntCRL35. Todos los genes sintéticos se clonaron en el vector pPICZ $\alpha$ A, para su expresión por *P. pastoris*. El vector pP- $\alpha$ hSUMO3 también se empleó para la clonación de *entHF* y *entCRL35* y expresión de las bacteriocinas fusionadas a la proteína hSUMO3, por *P. pastoris*. Solamente las levaduras recombinantes que expresaban bacteriocinas quimeras pero no las bacteriocinas híbridas y bacteriocinas fusionadas a la proteína hSUMO3, mostraron actividad antimicrobiana en sus sobrenadantes. Los análisis por MALDI-TOF MS no permitieron detectar las bacteriocinas en las fracciones resultantes de los sobrenadantes purificados pero los análisis por MRM-ESI-LC-MS/MS (QTRAP) si que lo permitieron. Los resultados obtenidos sugieren que EntA y EntP dirigen el procesamiento y secreción de bacteriocinas híbridas y bacteriocinas quimeras, producidas por *P. pastoris*.

En el capítulo VIII, se describe la clonación de genes sintéticos que codifican los (a), péptidos antimicrobianos (PAMs) microcina V (MccV), beta-defensina humana-3 (HBD-3), catelicidina 2 (dCATH-2) y pleurocidina (PleWF), (b) de péptidos híbridos derivados de la fusión de la enterocina A (EntA) a la MccV, HBD-3, dCATH-2 y PleWF, y (c) de bacteriocina-PAMs quimeras derivadas de la fusión de la región N-terminal de la EntA a la MccV, HBD-3, dCATH-2 y PleWF, por *P. pastoris*. Los resultados de este estudio preliminar sugieren que la EntA dirige el procesamiento y secreción de péptidos híbridos antimicrobianos y de las bacteriocinas-PAMs quimeras, por *P. pastoris*. Sin embargo, es necesario completar experimentos que permitan determinar la influencia de la región terminal de la EntA en la producción y purificación de las bacteriocinas-PAMs quimeras EntA::MccV, EntA::HBD-3, EntA::dCATH-2 y EntA::PleWF.

En el capítulo IX, se describe la secuencia genómica de *E. faecalis* DBH18, una cepa bacteriocinogénica aislada de ánades reales (*Anas platyrhynchos*). El ensamblaje de las secuencias obtenidas originó 2.836.724 pb con un contenido de G+C del 37,6%. El análisis de las secuencias resultantes confirmó la presencia de los genes estructurales y adyacentes de la enterocina JS (EntJSA-EntJSB), gelatinasa (GelE) y serina proteasa (SprE) y no la presencia de genes que codifican resistencias a antibióticos ni de los que codifican factores importantes de virulencia. Todo ello, facilitará la realización de estudios acerca de la producción de bacteriocinas sintetizadas sin una extensión N-terminal y refuerza el posible uso de *E. faecalis* DBH18 como productor seguro de péptidos bioactivos.

Finalmente, en el capítulo X se han utilizado técnicas de amplificación y secuenciación de amplicones que codifican 16S rRNAs y la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq para

evaluar el efecto de hidrolizados lácteos fermentados, derivados del desarrollo de *E. faecalis* DBH18 en leche desnatada de vaca (BSMH y BSMF) y de péptidos sintéticos antihipertensivos (LHLPLP y HLPLP), en la microbiota fecal humana y en su composición de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs). Pese a las limitaciones por el número de muestras analizadas parece que el impacto en la composición de la microbiota fecal humana y la producción de SCFAs, fué mayor tras la adición de los hidrolizados lácteos BSMH y BSMF.

The research work carried out in this doctoral thesis has been based on the use of classical microbiological and biochemical techniques as well as recent genetic engineering techniques, genomics and proteomics and describes, in separated chapters, the following objectives:

In chapter III, the identification and characterization of bacteriocinogenic lactic acid bacteria (LAB) isolated from the feces of Griffon vultures (*Gyps fulvus* subsp. *fulvus*), is described. All isolates were evaluated for their antimicrobial activity, genes coding for bacteriocins, potential virulence factors, antibiotic susceptibility and genotyping by ERIC-PCR and MLST. Purified bacteriocins were biochemically characterized by MALDI-TOF MS, N-terminal amino acid sequencing by Edman degradation, and *de novo* sequencing by MALDI TOF/TOF MS. It is worth to highlight the isolation and characterization of *E. faecium* M3K31, producer of enterocin HF (EntHF) and *E. faecalis* M3M42, that could be potentially proposed as producer of bioactive peptides.

In chapter IV, synthetic genes encoding the broad antimicrobial spectrum bacteriocins SCRCAM 602, OR-7, E-760 and L-1077, previously described for their antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, including *Campylobacter* spp. were cloned in the protein expression vector pPICZ $\alpha$ A, for expression by *P. pastoris*. However, none of the recombinant yeasts showed a direct antimicrobial activity whereas the antimicrobial activity potentially present in the supernatants, could only be evaluated through the use of a multichromatographic purification procedure. Furthermore, analysis of the purified fractions by MALDI-TOF MS and MALFI TOF/TOF revealed the presence in the samples of peptide fragments, not related to the deduced molecular mass of the cloned bacteriocins.

In chapter V, the use of circular dichroism (CD) and nuclear magnetic resonance (NMR) techniques permitted the evaluation of the three dimensional (3D) structure of the EntHF, produced by *E. faecium* M3K31. The purified EntHF was unstructured in water but adopted an alpha helix conformation when exposed to increasing concentrations of trifluoroethanol (TFE). Moreover, the results obtained suggest that the bacteriocin adopts an antiparallel beta-sheet structure in the N-terminal region, followed by a well-defined central alpha-helix, and a more unstructured C-terminal end. These three different domains could act in a coordinated manner. The 3D structure recorded for EntHf fits emerging facts regarding target recognition and mode of action of class IIa bacteriocins.

In chapter VI, the use of next generation sequencing techniques (NGS) and the Illumina MiSeq sequencing platform have permitted the determination of the draft genome of the bacteriocin-producing strain *E. faecium* M3K31, isolated from Griffon vultures (*Gyps fulvus* subsp. *fulvus*). The assembly of the sequences produced a total of 2,722,557 bp, with a G+C content of 38.1%. *In silico* analysis of the resulting sequences confirmed that *E. faecium* M3K31 encoded the EntHF structural gene, the EntP structural and immunity genes and the structural gene encoding a peptide 85% identical to bacteriocin SRCAM 602. The absence in the genome of a number of virulence-associated factors potentiates the recognition of this enterococcal strain as a safe feed additive. The presence of one clustered regularly interspaced

short palindromic repeat (CRISPR) array, considered a barrier to foreign DNA uptake was also detected in this strain.

In chapter VII, synthetic genes designed from (a), the native amino acid sequences of bacteriocins EntHF and EntCRL35, (b) hybrid bacteriocins derived from fusion of enterocin A (EntA) to itself (EntA), to EntHF and to EntCRL35, and (c) from bacteriocin-derived chimeras derived from fusion of the N-terminal region of EntA and EntP to the C-terminal region of EntHF and EntCRL35, were cloned in pPICZ $\alpha$ A for expression by *P. pastoris*. The expression vector pP- $\alpha$ hSUMO3 was also used to clone *entHF* and *entCRL35* to the hSUMO3 fusion protein. However, only recombinant *P. pastoris* expressing the bacteriocin-derived chimeras but not the bacteriocins fused to hSUMO3, displayed antimicrobial activity in their supernatants. MALDI-TOF MS analysis of purified fractions from yeasts producers of native, hybrid, bacteriocin-derived chimeras and hSUMO3-fused bacteriocins, did not reveal the presence in the samples of peptides with the expected molecular mass of the bacteriocins being evaluated. However, MRS-ESI-LC-MS/MS (QTRAP) analysis revealed the presence of the expected bacteriocins in the purified fractions. The results obtained suggest that EntA and EntP could drive the processing and secretion of hybrid and bacteriocin-derived chimeras produced by *P. pastoris*.

In chapter VIII, synthetic genes designed from (a) the antimicrobial peptides (AMPs) microcin V (MccV), human beta-defensin 3 (HBD-3), cathelicidin 2 (dCATH-2) and pleurocidin (PleWF), (b) hybrid peptides derived from fusion of mature EntA to MccV, HBD-3, dCATH-2 and PleWF, and (c) bacteriocin-AMPs chimeras derived from fusion of the N-terminal region of EntA to MccV, HBD-3, dCATH-2 and PleWF, were cloned in pPICZ $\alpha$ A for expression by *P. pastoris*. Preliminary results suggest that EntA drives the processing and secretion of hybrid peptides and the bacteriocin-AMPs-derived chimeras by *P. pastoris*. However, more experiments need to be completed to ascertain the influence of N-terminal region of EntA in the production and further purification of the bacteriocin-AMPs-derived chimeras EntA::MccV, EntA::HBD-3, EntA::dCATH-2 and EntA::PleWF.

In chapter IX, the draft genome sequence of *E. faecalis* DBH18, a bacteriocinogenic strain isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*), is reported. The assembly of the sequences produced 2,836,724, with a G+C content of 37.6%. The analysis of the resulting sequences confirmed the presence in *E. faecalis* DBH18 of the structural and adjacent genes for synthesis of the enterocin JS (EntJSA-EntJSB), gelatinase (GelE) and serine protease (SprE), and the absence of genes encoding antibiotic resistances and potential virulence factors. These results would facilitate studies on the synthesis of bacteriocins without a N-terminal extension and strengthen the usefulness of *E. faecalis* DBH18 as a safe producer of bioactive peptides.

Finally, in chapter X the use of 16S rRNA gene sequencing techniques and the Illumina MiSeq platform were used to evaluate the effect of milk fermented hydrolysates, derived from growth of *E. faecalis* DBH18 in bovine skim milk (BSMH and BSMF) and the use of chemically synthesized peptides (LHLPLP and HLPLP), for their effect on the human fecal

microbiota and composition of short chain fatty acids (SCFAs). Despite limitations in the number of analysed samples it seems that the bovine-skim milk derived hydrolysates BSMH and BSMF produced a larger impact on the fecal microbiota and production of SCFAs than the use of the synthetic peptides LHLPLP and HLPLP.

**CAPÍTULO**  
***CHAPTER***

**I**

**EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A  
INVESTIGAR: OBJETIVOS**

---

***GENERAL ACCOUNT OF THE RESEARCH PROBLEM:  
OBJECTIVES***





Los microorganismos patógenos resistentes a antibióticos constituyen una amenaza creciente para la salud pública (FAO/WHO, 2014). Dicha resistencia compromete la prevención y el tratamiento eficaces de un número cada vez mayor de infecciones causadas por bacterias, parásitos, virus y hongos. La asistencia sanitaria y la producción animal se encarecen y la seguridad alimentaria, el comercio y la economía se ven afectados. Las bacterias transmisibles por alimentos y responsables de toxiinfecciones alimentarias como *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* patógenas y *Listeria monocytogenes* muestran cada vez más frecuentemente fenotipos resistentes antibióticos, de difícil tratamiento y que hacen conveniente la utilización de barreras complementarias para reducir su prevalencia y garantizar la seguridad de los alimentos. La concienciación y demanda por parte de los consumidores, así como la actual legislación alimentaria hacen que la tarea de producir alimentos de elevada calidad y seguridad constituya un reto para la industria alimentaria. Los consumidores exigen la presencia en el mercado de alimentos de mayor calidad, sin conservantes, seguros, poco procesados y de mayor vida útil lo que impone a la industria alimentaria a desarrollar metodologías y enfoques innovadores para garantizar la calidad y seguridad de los alimentos producidos.

En este contexto, se están desarrollando estrategias para sustituir o complementar las terapias antibióticas humanas y animales y los métodos tradicionales de mantenimiento de la calidad microbiológica de los alimentos mediante el uso de bacteriofagos (Inal, 2003), la utilización de bacterias probióticas en alimentos funcionales o para inhibir el desarrollo de microorganismos no deseados (Sarkar, 2013; Fernández et al., 2014; Amara y Shibl, 2015; Islam, 2016; el uso de péptidos antimicrobianos producidos por procariotas y denominados bacteriocinas (Cotter et al., 2013) o de los péptidos producidos por eucariotas y denominados péptidos antimicrobianos (PAMs) o péptidos de defensa del hospedador (PDHs) (PAMs/PDHs) (Rydlo et al., 2006), así como la utilización de otros péptidos bioactivos con actividad antimicrobiana (Perez Espitia et al., 2012; Valladão et al., 2015). También es importante destacar el papel de la microbiota como componente funcional de un hábitat determinado. La composición de la microbiota del tracto gastrointestinal (TGI) humano se ha asociado a alteraciones metabólicas, trastornos gastrointestinales, obesidad, diabetes e incluso cáncer de colon y, por ello, debe también tenerse en cuenta en el mantenimiento de la salud del hospedador (Sekirov et al., 2010; Patterson et al., 2016).

Por ello, en este trabajo se ha procedido a la búsqueda, identificación, caracterización bioquímica y genética y determinación de la estructura molecular de bacteriocinas de elevada actividad antimicrobiana y amplio espectro de acción producidas por bacterias lácticas (BAL), así como a la producción heteróloga de las bacteriocinas más activas, de bacteriocinas híbridas y de quimeras de bacteriocinas por la levadura *P. pastoris* X-33. Células competentes de *P. pastoris* X-33 también se han utilizado como hospedadores para la producción heteróloga de péptidos antimicrobianos de origen eucariota (PAMs/PDHs), de PAMs/PDHs híbridos y de PAMs/PHDs quimeras. También se ha procedido a la secuenciación del genoma de BAL productoras de bacteriocinas y/o de BAL bacteriocinogénicas, responsables de la producción de hidrolizados de elevada actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina (AIECA) y con actividad antihipertensiva y antioxidante, durante su desarrollo en leche

desnatada de vaca (LDV). Finalmente, se ha procedido a evaluar el efecto de hidrolizados lácteos con elevada AIECA, antihipertensiva y antioxidante y de dos péptidos bioactivos con elevada actividad AIECA, por su actividad en la microbiota fecal humana y la liberación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC).

Por consiguiente, los objetivos de este trabajo de investigación han sido los siguientes:

1. Caracterización bioquímica y genética de bacterias lácticas (BAL) y de sus bacteriocinas, aisladas de heces de buitre leonado (*Gyps fulvus* subespecie *fulvus*).
2. Clonación de genes sintéticos, deducidos de la secuencia aminoacídica de las bacteriocinas de amplio espectro de acción SRCAM 602, OR-7, E-760 y L-1007 en el vector de expresión proteica pPICZ $\alpha$ A y evaluación de su expresión por la levadura *Pichia pastoris* X-33.
3. Purificación a homogeneidad y determinación, mediante técnicas de Dicroísmo Circular (CD) y Resonancia Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$ -RMN), de la estructura molecular de la bacteriocina enterocina HF (EntHF) en solución.
4. Secuenciación del genoma de *Enterococcus faecium* M3K31, productor de la enterocina HF (EntHF), mediante el empleo de técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos de nueva generación (NGS).
5. Diseño, clonación, producción y expresión funcional de diversas bacteriocinas, bacteriocinas híbridas y bacteriocinas quimeras mediante la clonación de genes sintéticos, responsables de su síntesis, en el vector de expresión proteica pPICZ $\alpha$ A y evaluación de su expresión por la levadura *Pichia pastoris* X-33. Para ello se han abordado las siguientes aproximaciones:
  - (5a). Diseño de genes sintéticos que codifican la enterocina HF (EntHF), enterocina CRL35 (EntCRL35) y la avicina A (AviA), con el codon de uso para su expresión por *Pichia pastoris* X-33.
  - (5b). Diseño de genes sintéticos que codifican las bacteriocinas híbridas enterocina A (EntA) fusionada a la misma EntA (EntA::L::EntA), la EntA fusionada a la EntHF (EntA::L::EntHF) y la EntA fusionada a la EntCRL35 (EntA::L::EntCRL35), con el codon de uso para su expresión por *Pichia pastoris* X-33 y donde L se refiere a la secuencia de fusión de la EntA a las otras bacteriocinas mediante tres aminoácidos neutros.
  - (5c). Diseño de genes sintéticos que codifican las quimeras derivadas de la fusión génica de las regiones N-terminal de la EntA a la región C-terminal de la EntHF (EntHF::EntHF) y EntCRL35 (EntA::EntCRL35) y de fusión de la región N-terminal de la enterocina P (EntP) a la región C-terminal de la EntHF (EntP::EntHF) y EntCRL35 (EntP::EntCRL35), con el codon de uso para su expresión por *Pichia pastoris* X-33.

6. Clonación, producción y expresión funcional de las bacteriocinas enterocina HF (EntHF) y enterocina CRL35 (EntCRL35), mediante el sistema de expresión de fusión de proteínas SUMOpro3 en la levadura *Pichia pastoris* X-33.
7. Diseño, clonación, producción y expresión funcional de péptidos antimicrobianos (PAMs) de diverso origen y de PAMs híbridos mediante la clonación de genes sintéticos, responsables de su síntesis, en el vector de expresión proteica pPICZαA y evaluación de su expresión por la levadura *Pichia pastoris* X-33. Para ello se han abordado las siguientes aproximaciones:
  - (7a). Diseño de genes sintéticos que codifican la bacteriocina microcina V (MccV) y los péptidos antimicrobianos (PAMs) β-defensina humana-3 (HBD-3), catelicidina aviar-2 (CATH-2) y pleurocidina WF (PleWF), con el codon de uso para su expresión por *Pichia pastoris* X-33.
  - (7b). Diseño de genes sintéticos que codifican la bacteriocina híbrida EntA::L::MccV y los PAMs híbridos EntA::L::HBD-3, EntA::L::CATH-2 y EntA::L::PleWF, con el codon de uso para su expresión por *Pichia pastoris* X-33 y donde L se refiere a la secuencia de fusión de la EntA a la bacteriocina MccV y a tres PAMs de diverso origen mediante tres aminoácidos neutros.
  - (7c). Diseño de genes sintéticos que codifican los PAMs quimeras derivados de la fusión de la región N-terminal de la EntA a la secuencia madura de la MccV (EntA::MccV), la HBD-3 (EntA::HBD-3), la CATH-2 (EntA::CATH2) y la PleWF (EntA::PleWF), con el codón de uso para su expresión por *Pichia pastoris* X-33.
8. Secuenciación del genoma de *Enterococcus faecalis* DBH18, una cepa bacteriocinogénica productora de gelatinasa (GeIE) y responsable de la producción de hidrolizados de elevada AIECA, antihipertensiva y antioxidante, durante su desarrollo en leche desnatada de vaca (LDV).
9. Evaluación del efecto de hidrolizados lácteos conteniendo péptidos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (PI-ECA), en la microbiota fecal humana y la liberación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Para ello, se evaluó el efecto de:
  - (9a). Hidrolizados lácteos, derivados del desarrollo de *E. faecalis* DBH18 en leche desnatada de vaca (LDV) y con elevada AIECA, antihipertensiva y antioxidante.
  - (9b). Los péptidos sintéticos LHLPLP y HLPLP con elevada AIECA y antihipertensiva.

Pathogenic microorganisms resistant to antibiotics are a growing threat for public health (FAO/WHO, 2014). The antimicrobial resistance to antibiotics compromises the effective prevention and treatment of an increasing number of infections caused by bacteria, parasites, viruses and fungi. Health care and animal production for human consumption raise the price and food safety, economy and trade become affected. Food-borne pathogens such as *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, pathogenic *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains show everyday more often resistant phenotypes to antibiotics, with infections difficult to treat. Consequently, complementary barriers are needed to ensure the quality and safety of foods. Consumer awareness and food safety laws are challenging the food industry to develop innovative approaches to ensure the presence in the food market of high quality products, with less preservatives, minimally processed and long lasting.

Within this context alternative strategies to complement and/or substitute traditional antibiotic therapies and conventional food preservation methods are arising, such as the use of bacteriophages (Inal, 2003), the use of probiotic bacteria as functional foods or as treatment to replace undesirable microorganisms (Sarkar, 2013; Fernández et al., 2014; Amara and Shibl, 2015; Islam, 2016), the use of antimicrobial peptides produced by bacteria (bacteriocins) (Cotter et al., 2013) or eukaryotes, known as antimicrobial peptides or host defense peptides (AMPs/HDPs) (Rydlo et al., 2006) and the use of bioactive peptides with antimicrobial activity (Perez Espitia et al., 2012). The microbiota also plays a crucial role as a vital organ keeping the balance of a certain habitat. The human gut microbiota is involved in gastrointestinal disorders, obesity, diabetes or colon cancer and should be considered as an important factor in maintaining host's health (Sekirov et al., 2010; Patterson et al., 2016).

Accordingly, this work has focused on the search, identification, biochemical and genetic characterization and molecular structural determination of bacteriocins produced by lactic acid bacteria (LAB) with high antimicrobial activity and broad spectrum, as well as in the heterologous production, by *Pichia pastoris* X-33, of the most active natural, hybrid and chimera bacteriocins. Competent *P. pastoris* X-33 cells have been also used as hosts for the heterologous production of antimicrobial peptides produced by eukaryotic cells (AMPs/HDPs), hybrid AMPs/HDPs and chimera AMPs/HDPs. Genome sequencing of bacteriocin producing LAB and bacteriocinogenic LAB, producing hydrolysates with high angiotensin converting enzyme inhibitory activity (ACE-IA), antihypertensive and antioxidant activities during their growth in bovine skim milk (BSM), was also carried out. Likewise, the effect of BSM-derived hydrolysates and two synthetic peptides with high ACE-IA on human fecal microbiota and the production of short chain fatty acids (SCFAs) was also evaluated.

Accordingly, the following have been the objectives addressed in this research work:

1. Biochemical and genetic characterization of lactic acid bacteria (LAB) and their bacteriocins, isolated from Griffon vulture (*Gyps fulvus* subspecies *fulvus*) feces.

2. Cloning of synthetic genes, deduced from the amino acid sequence of the broad spectrum bacteriocins SRCAM602, OR-7, E-760 y L-1007 in the pPICZ $\alpha$ A protein expression vector, and evaluation of their expression by the yeast *Pichia pastoris* X-33.
3. Purification to homogeneity and determination of the solution structure of the bacteriocin enterocin HF (EntHF) by Circular Dichroism (CD) and Nuclear Magnetic Resonance ( $^1\text{H}$ -RMN).
4. Draft genome sequencing of *Enterococcus faecium* M3K31, producer of enterocin HF (EntHF), by using Next Generation Sequencing techniques (NGS).
5. Design, cloning, production and functional expression by *Pichia pastoris* X-33 of bacteriocins, hybrid bacteriocins and bacteriocin chimeras using synthetic genes and the protein expression vector pPICZ $\alpha$ A. The following was performed:
  - (5a). Design of synthetic genes coding enterocin HF (EntHF), enterocin CRL35 (EntCRL35) and avicin A (AviA), matching the codon bias for expression by *Pichia pastoris* X-33.
  - (5b). Design of synthetic genes coding for the hybrid bacteriocins enterocin A (EntA) fused to EntA (EntA::L::EntA), EntA fused to EntHF (EntA::L::EntHF) and EntA fused to EntCRL35 (EntA::L::EntCRL35), matching the codon bias for expression by *Pichia pastoris* X-33. L refers to the link between EntA and the other bacteriocins by using three neutral amino acids.
  - (5c). Design of synthetic genes coding for chimeras derived from the fusion of the N-terminal region of EntA to the C-terminal region of EntHF (EntA::EntHF) and EntCRL35 (EntA::EntCRL35) and from the fusion of the N-terminal region of EntP to the C-terminal region of EntHF (EntP::EntHF) and EntCRL35 (EntP::EntCRL35), matching the codon bias for expression by *Pichia pastoris* X-33.
6. Cloning, production and functional expression of the enterocin HF (EntHF) and enterocin CRL35 (EntCRL35) by *Pichia pastoris* X-33, using the SUMOpro3 fusion expression system.
7. Design, cloning, production and functional expression by *Pichia pastoris* X-33 of antimicrobial peptides (AMPs) from different origins and hybrid AMPs using synthetic genes and the protein expression vector pPICZ $\alpha$ A. The following was performed:
  - (7a). Design of synthetic genes coding for microcin V (MccV) and the antimicrobial peptides human  $\beta$ -defensin-3 (HBD-3), a derived aviar cathelicidin-2 (dCATH-2) and pleurocidin WF (PleWF), matching the codon bias for expression by *Pichia pastoris* X-33.

(7b). Design of synthetic genes coding the hybrid EntA::L::MccV and the hybrid AMPs EntA::L::HBD-3, EntA::L::dCATH-2 and EntA::L::PleWF, matching the codon bias for expression by *Pichia pastoris* X-33. L refers to the link between EntA and the bacteriocin MccV and other AMPs by using three neutral amino acids.

(7c). Design of synthetic genes coding the AMPs chimeras derived from the fusion of the N-terminal region of EntA to the mature sequence of MccV (EntA::MccV), HBD-3 (EntA::HBD-3), dCATH-2 (EntA::dCATH-2) and PleWF (EntA::PleWF), matching the codon bias for expression by *Pichia pastoris* X-33.

8. Draft genome sequencing of *Enterococcus faecalis* DBH18, a bacteriocinogenic and gelatinase (GelE) producer strain responsible of the production of hydrolysates with high ECA-IA, antihypertensive and antioxidant activities during its growth in bovine skim milk (BSM), by using Next Generation Sequencing techniques (NGS).
9. Evaluation of BSM-derived hydrolysates containing ACE-inhibitory peptides (ACE-IP), on human fecal microbiota and the production of short chain fatty acids (SCFAs). The evaluation was performed with:

(9a). Milk-derived hydrolysates generated from growth of *E. faecalis* DBH18 on bovine skim milk (BSM) and with high ACE-IA, antihypertensive and antioxidant activities.

(9b). The synthetic ACE-IP inhibitory peptides LHLPLP and HLPLP with elevated ACE-IA and antihypertensive activity.

# CAPÍTULO

II

## INTRODUCCIÓN

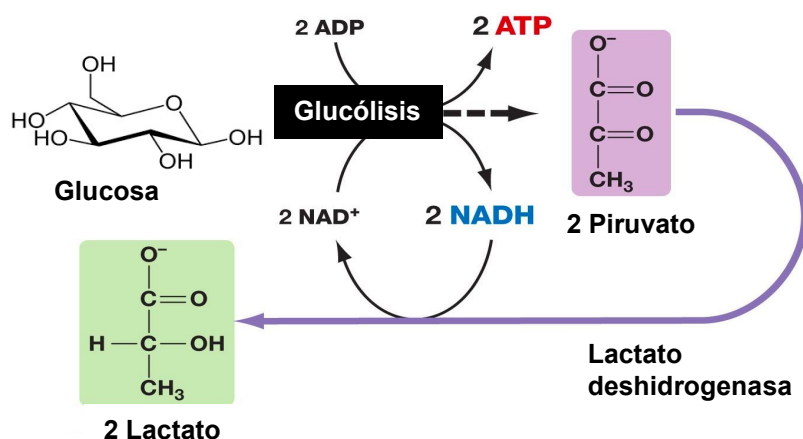
---





## II.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y CONSIDERACIONES TAXONÓMICAS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacterias lácticas, bacterias productoras de ácido láctico o bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen un grupo de microorganismos muy heterogéneo desde el punto de vista morfológico, fisiológico y ecológico que se engloba dentro del grupo clostridial de las eubacterias Gram-positivas (contenido de G+C <55 mol%) y cuya característica principal es la producción de ácido láctico como metabolito mayoritario de la fermentación de los hidratos de carbono (Figura 2.1). En general, las BAL son microorganismos de morfología cocoide, bacilar o cocobacilar, no esporulados, catalasa-negativos, microaerófilicos o anaerobios facultativos, ácido-tolerantes, carentes de citocromos y con un metabolismo fermentativo (Stiles y Holzapfel, 1997; Cintas et al. 2000; Carr et al., 2002; Sampo et al., 2011).



**Figura 2.1 Esquema de la fermentación láctica.**

Adaptado de Pearson Education, Inc., 2011.

Las BAL se engloban dentro del filo o filum *Firmicutes*, clase *Bacilli*, familia *Lactobacillales* y comprenden bacterias de los géneros *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (De Vuyst y Vandamme, 1994; Stiles y Holzapfel, 1997; Cintas et al., 2000a; Claesson et al., 2007; Ogier y Serror, 2008 a, b; De Vos et al., 2009). Tradicionalmente, el género *Bifidobacterium* también se ha considerado dentro del grupo de las BAL debido a que posee características morfológicas y fisiológicas semejantes; no obstante, las bifidobacterias se encuentran más relacionadas filogenéticamente con el filo *Actinobacteria* de las eubacterias Gram-positivas (contenido de G+C >55 mol%) y, además, poseen una ruta específica de fermentación de los azúcares, catalizada por la enzima fructosa-6-fostato fosfoacetolasa, lo que las separa del grupo de BAL (Pokusaeva et al., 2011).

Las BAL se localizan en hábitats ricos en nutrientes caracterizados por la presencia de hidratos de carbono solubles y productos de la degradación de proteínas y vitaminas y con baja tensión de oxígeno como la leche y productos lácteos fermentados, carne y productos cárnicos fermentados, pescado y derivados de la pesca, frutas y hortalizas frescas y en productos vegetales fermentados, ensilados y diversas bebidas. Las BAL también forman parte de la

microbiota asociada a mucosas de los mamíferos y otros animales y se han aislado del suelo, estiércol y aguas residuales (Holzapfel et al., 2001; Carr et al., 2002; von Wright et al., 2012; Kostic et al., 2013).

### **II.1.1. LAS BACTERIAS LÁCTICAS COMO PROBIÓTICOS**

#### **II.1.1.1. Definición y principales características de los probióticos**

El término probiótico fue definido por Fuller (1989) como “microorganismos vivos que en forma de suplementos alimentarios afectan beneficiosamente al hospedador mediante una mejora de su equilibrio intestinal”. Actualmente, de acuerdo con la definición de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, del inglés *Food and Agriculture Organization*) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) los probióticos se consideran "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del hospedador" (FAO/WHO, 2002). La popularidad de los probióticos ha aumentado considerablemente en las últimas décadas debido tanto a su demanda por la industria alimentaria para la elaboración de alimentos funcionales (principalmente yogur y otros derivados lácteos fermentados) como por representar una nueva estrategia profiláctica y terapéutica en medicina humana y veterinaria y en producción animal.

La obtención de cepas bacterianas para su empleo como probióticos se basa normalmente en el aislamiento inicial de microorganismos comensales de individuos sanos y en la evaluación de su estabilidad, beneficio, seguridad e inocuidad para el hospedador (Salminen et al., 1996; Saarela et al., 2000; Gardiner et al., 2002; Gueimonde et al., 2012). Entre los numerosos efectos beneficiosos derivados del consumo de probióticos se incluyen los siguientes: (i) disminución de la duración de las diarreas infecciosas, de las secundarias al tratamiento con antibióticos y de las originadas por rotavirus; (ii) mejora de la digestibilidad de la lactosa; (iii) control de *Helicobacter pylori*; (iv) mejora de la enfermedad inflamatoria intestinal; (v) control del síndrome del intestino irritable; (vi) reducción del riesgo de alergias en niños; (vii) disminución de las infecciones urogenitales; (viii) reducción del nivel de colesterol sanguíneo; (ix) disminución del riesgo de cáncer de colon; (x) efectos nutricionales (mejora en la absorción del calcio, aumento de la síntesis de vitaminas y mejora de la digestión de proteínas); (xi) actividad antihipertensiva; (xii) mejora del desarrollo cognitivo, y (xiii) regulación del estado de ánimo, ansiedad y salud mental (Nagpal et al., 2012; Kailasapathy, 2016).

Cabe destacar que los efectos beneficiosos de los probióticos son específicos de cepa y que, cada cepa de forma individual e independientemente del grupo bacteriano al que pertenezca, debe cumplir los criterios de idoneidad propuestos por las distintas autoridades sanitarias.

#### **II.1.1.2. Evaluación de la seguridad de los probióticos**

Evaluar la seguridad de los probióticos es de suma importancia para su empleo en medicina humana y veterinaria y en producción animal (Sanders et al., 2010; Franz et al. 2010; Salminen y von Wright, 2012). En un documento conjunto titulado: "*Guidelines for the Evaluation of*

*Probiotics in Food*" (FAO/WHO, 2002), la FAO y la OMS recogen los requerimientos para que un microorganismo probiótico pueda considerarse seguro: (1) identificación taxonómica mediante pruebas genotípicas y fenotípicas; (2) caracterización funcional mediante estudios *in vitro* en animales; (3) evaluación de la seguridad *in vitro* y/o en animales y estudios en personas. Entre los estudios de seguridad *in vitro* se incluyen la determinación de (i) la resistencia a antibióticos, (ii) la presencia de factores de virulencia o producción de toxinas, (iii) su actividad hemolítica y (iv) ciertas actividades metabólicas (p. ej., producción de D-lactato y desconjugación de la bilis); (4) determinación de su eficacia y, por último (5) etiquetado, presentación y publicidad.

En Estados Unidos (EE.UU.), los microorganismos probióticos utilizados en alimentos deben poseer el estatus GRAS (del inglés, *Generally Recognized As Safe*) establecido por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) (Bourdichon et al., 2012). No obstante, en la Unión Europea (UE) los microorganismos empleados en la elaboración de alimentos se consideran “ingredientes” por lo que, según el Reglamento (CE) nº 178/2002, los responsables de las empresas alimentarias son los encargados de garantizar la seguridad de los mismos (Bourdichon et al., 2012). Asimismo, en la UE la EFSA (EFSA, del inglés *European Food Safety Authority*) adoptó el concepto QPS (del inglés, *Qualified Presumption of Safety*) como aproximación a la evaluación de la seguridad de los microorganismos empleados en alimentos y piensos (EFSA, 2005, 2007). Las BAL con estatus QPS propuestas en la última revisión de la lista de agentes biológicos añadidos deliberadamente a los alimentos y piensos, se muestra en la Tabla II.1 (EFSA, 2013, actualización 2015).

Determinadas especies del grupo de las BAL también se permiten y emplean como aditivos en alimentación animal. En la UE, el Reglamento (CE) nº 1831/2003 establece un procedimiento comunitario para la autorización, comercialización y uso de aditivos para alimentación animal, lo que requiere, tanto la demostración de su seguridad para la especie diana y para los consumidores como de su eficacia nutricional o sanitaria. Además, todo ello puede traducirse en una mejora del crecimiento y la tasa de conversión de los piensos y/o en una morbilidad/mortalidad reducida de los animales, así como en beneficios para el consumidor derivados de la mejora de la calidad de los alimentos consumidos. El Reglamento (CE) nº 1831/2003 incluye los microorganismos probióticos dentro del grupo de “estabilizadores de la flora intestinal” de la categoría de aditivos zootécnicos, constituido por microorganismos y otras sustancias que, administradas a los animales mejoran su ganancia ponderal y tienen un efecto positivo en el medio ambiente. Dentro de las BAL se autorizan como probióticos para su empleo como aditivos zootécnicos en pollos y gallinas ponedoras, lechones y cerdas, terneros, salmónidos y otros peces y/o mariscos cepas de las especies *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subespecie *lactis*, *Lb. delbrueckii* subesp. *bulgaricus*, *Lb. farciminis*, *Lb. helveticus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. salivarius*, *Pediococcus acidilactici* y *Streptococcus thermophilus*.

**Tabla II.1. Bacterias lácticas con estatus QPS<sup>a</sup>**

<i>Carnobacterium divergens</i>		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus panis</i>
<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	<i>Lactobacillus farciminis</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	<i>Lactobacillus gallinarum</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>
<i>Lactobacillus aviaries</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus pontis</i>
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	<i>Lactobacillus kefiranoferiens</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	<i>Lactobacillus kefir</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Lactobacillus mucosae</i>	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Lactobacillus collinoides</i>	
<i>Lactococcus lactis</i>		
<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>Leuconostoc lactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>		
<i>Oenococcus oeni</i>		
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Pediococcus dextrinicus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>		

<sup>a</sup> Esta lista de microorganismos con estatus QPS, propuesta por la EFSA, se actualiza anualmente como consecuencia de las evaluaciones periódicas de seguridad. EFSA, actualización de diciembre de 2015.

De lo descrito hasta ahora se desprende que la mayoría de BAL se consideran seguras para el consumo humano y animal (estatus GRAS y/o QPS y utilización como aditivos zootécnicos) y que se perciban por los consumidores como algo “natural” y beneficioso para la salud. No obstante, las BAL también se encuentran relacionadas con la alteración de los alimentos, la producción de metabolitos tóxicos, la transferencia de determinantes genéticos de resistencia a antibióticos y/o el desarrollo de infecciones oportunistas, que no deben menospreciarse (Bourdichon et al., 2012). Procesos en los que las BAL podrían actuar como alterantes de los alimentos serían: (i) carnes y pescados envasados en anaerobiosis o en atmósferas modificadas en las que producen acidez, sabores y olores anómalos, exudados lechosos y limosidad, hinchazón de los envases por producción de gas y decoloración (Björkroth et al., 2000; Joffraud et al., 2001; Lyhs et al., 2001; Vermeiren et al., 2004; Lyhs y Björkroth, 2008); (ii) vinos con una fermentación maloláctica indeseable lo que resulta en agriado, sabores defectuosos, turbidez, lodos, decoloración y viscosidad; estas alteraciones también pueden producirse por el desarrollo de BAL que no intervienen en la fermentación maloláctica (Fleet, 1999, 2001), y (iii) cervezas, en las que el desarrollo de las BAL origina una acidez excesiva, sabores y aromas defectuosos, turbidez, filamentosidad, sedimentos, viscosidad y decoloración (Campbell, et al., 1997; Hartnett et al., 2002; Sakamoto y Konings, 2003; March et al., 2005).

Las BAL también se desarrollan en alimentos fermentados como el queso, el vino y los embutidos crudos curados, bien como consecuencia de su utilización como cultivos iniciadores o

como constituyentes de su microbiota saprofita pudiendo dar lugar, durante el proceso de maduración o envejecimiento a la formación de aminas biógenas (p. ej., histamina, tiramina, putrescina y cadaverina), que son sustancias vaso- y psicoactivas (ten Brink et al., 1990; Silla Santos, 1996). El consumo de alimentos con elevadas cantidades de aminas biógenas puede originar cuadros toxicológicos (p. ej., náuseas, alteraciones respiratorias, sofocos, sudoración, palpitaciones, cefaleas, erupciones cutáneas e hiper- e hipotensión) cuyas consecuencias para la salud pueden, en personas sensibles a su actividad o en personas que consumen elevadas cantidades de alimentos con aminas biógenas, llegar a ser graves (Giraffa, 2002; Suzzi y Gardini, 2003).

Asimismo, a pesar de su efecto beneficioso en la maduración de alimentos fermentados y de su consideración como microorganismos probióticos para las personas y de su utilización como aditivos zootécnicos en producción animal, cepas del género *Enterococcus* pueden actuar como patógenos oportunistas, especialmente cuando se diseminan fuera del intestino, se localizan en ambientes hospitalarios y colonizan en personas inmunodeprimidas, habiéndose descrito diversos factores potenciales de virulencia relacionados con su patogenicidad (Franz et al., 2011).

Las BAL también muestran resistencias a antibióticos utilizados en medicina humana y producción animal. El Panel sobre Aditivos y Productos o Sustancias utilizadas en Alimentación Animal (FEEDAP) de la EFSA, ha elaborado un documento orientado a determinar la susceptibilidad a antibióticos de microorganismos que pretendan emplearse como aditivos en alimentación animal (EFSA, 2012a). Por ello, las BAL con resistencia intrínseca frente a uno o varios antibióticos podrían ser empleadas como aditivos en alimentación animal. Sin embargo, en el caso de BAL con resistencias adquiridas a antibióticos deberá determinarse la base genética de las mismas, excepto en el caso de las cepas de *E. faecium* que manifiesten una concentración mínima inhibitoria (CMI)  $>2 \mu\text{g/ml}$  para la ampicilina, en cuyo caso, serán excluidas directamente para su utilización como aditivos en alimentación animal.

### II.1.1.3. Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas

Las BAL poseen la capacidad de inhibir el desarrollo de microorganismos alterantes y/o patógenos presentes potencialmente en los alimentos. El efecto antimicrobiano primario de las BAL se debe a la competencia por los nutrientes del sustrato y a la formación de ácidos orgánicos (ácidos láctico y acético, principalmente), con el consiguiente descenso del pH. No obstante, las BAL también producen otras sustancias antimicrobianas como etanol, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído, peróxido de hidrógeno y otros metabolitos del oxígeno, isómeros D de los aminoácidos, reuterina y otros compuestos no proteícos de pequeño tamaño molecular y, por último, péptidos antimicrobianos de origen ribosomal denominados bacteriocinas (Lücke, 2000; Nes et al., 2002; Ross et al., 2002; Gálvez et al., 2007; Deegan et al., 2006). De las sustancias antimicrobianas producidas por las BAL, las bacteriocinas son las más interesantes tecnológicamente para la bioconservación de los alimentos, ya que por su naturaleza proteica podrían ser degradadas por las enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal (TGI) mientras permanecerían activas en los sustratos alimenticios y, además, no parecen ser tóxicas ni

inmunógenas (Klaenhammer, 1988; Jack et al., 1995; Nes et al., 1996). Asimismo, la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas frente a microorganismos patógenos que afectan a las personas y/o a los animales resulta de interés para la industria farmacéutica, debido a su posible empleo como estrategia complementaria o alternativa a la terapia con antibióticos en medicina humana y veterinaria.

### II.1.2. EL GÉNERO *ENTEROCOCCUS*

Dentro de las BAL de interés en la industria alimentaria, medicina humana y veterinaria y producción animal, se encuentran las del género *Enterococcus*. Actualmente el género *Enterococcus* se divide en 36 especies, subdivididas en 6 grupos denominados *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. cecorum* y el grupo de los *Enterococcus* sp. no agrupados (Byappanahalli et al., 2012) (Tabla II.2).

**Tabla II.2. Especies descritas del género *Enterococcus*<sup>a</sup>**

<b><i>E. faecalis</i></b>		<b><i>E. avium</i></b>	
<i>E. faecalis</i>	<i>E. silesiacus</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. pallens</i>
<i>E. haemoperoxidus</i>	<i>E. termitis</i>	<i>E. pseudoavium</i>	<i>E. hermanniense</i>
<i>E. moraviensis</i>	<i>E. caccae</i>	<i>E. malodoratus</i>	<i>E. devriesei</i>
		<i>E. raffinosus</i>	<i>E. viikkiensis</i>
		<i>E. gilvus</i>	
<b><i>E. faecium</i></b>		<b><i>E. gallinarum</i></b>	
<i>E. faecium</i>	<i>E. canis</i>	<i>E. gallinarum</i>	
<i>E. durans</i>	<i>E. ratti</i>	<i>E. casseliflavus</i>	
<i>E. hirae</i>	<i>E. asini</i>		
<i>E. mundtii</i>	<i>E. phoeniculicola</i>		
<i>E. villorum</i>	<i>E. canintestini</i>		
	<i>E. thailandicus</i>		
<b><i>E. cecorum</i></b>		<b>No agrupados</b>	
<i>E. cecorum</i>		<i>E. saccharolyticus</i>	<i>E. dispar</i>
<i>E. columbae</i>		<i>E. aquimarinus</i>	<i>E. italicus</i>
		<i>E. sulfureus</i>	<i>E. camelliae</i>

<sup>a</sup>Adaptado de Byappanahalli et al., (2012).

Los enterococos son bacterias Gram-positivas de morfología cocoide, catalasa y oxidasa negativas, inmóviles, anaerobias facultativas y no formadoras de esporas ni cápsulas. Se pueden desarrollar en un amplio rango de temperaturas (10-45°C) y en condiciones relativamente adversas (6,5% de cloruro sódico, amplio rango de pH entre 4,6 y 9,6-10, en presencia de un 40% de sales biliares o en medios con un 0,04% de azida de sodio. Además, pueden sobrevivir a temperaturas de 60°C durante 30 minutos.

Los enterococos son ubicuos, se localizan en el suelo, en los alimentos, en el agua, en las plantas y en los insectos, además de constituir una parte importante de la flora gastrointestinal (GI) del hombre y los animales (Byappanahalli et al., 2012; Nes et al., 2014). Las especies *E. faecium* y *E. faecalis* son las que con mayor frecuencia se aíslan del tracto GI de muchos mamíferos, otros

animales y de una gran variedad de alimentos, principalmente de los de origen animal como la leche y productos lácteos y los embutidos crudos curados (Herranz et al., 1999).

La presencia de enterococos en los alimentos es, en muchas ocasiones, beneficiosa desde un punto de vista tecnológico y de seguridad alimentaria. Se ha comprobado que los enterococos mejoran características sensoriales como el aroma y el sabor de los alimentos fermentados (Weimer, 2007), contribuyendo a la obtención de productos únicos desde el punto de vista organoléptico (Franz et al., 2003). Por otro lado, los enterococos también se han empleado como cultivos iniciadores en productos tradicionales y artesanales, sobre todo, en quesos, embutidos y aceitunas de países mediterráneos en los que la fermentación se realiza por la flora endógena del alimento (Hugas et al., 2003; Omar et al., 2004) y, como probióticos tanto para personas como animales (Chaucheyras-Durand y Durand, 2010; Araújo y Ferreira, 2013). Además, algunos enterococos producen péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) antagonistas del desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos eliminando o reduciendo su presencia de los alimentos y, mejorando, de este modo, su seguridad (Nes et al., 2007, 2014).

Por otro lado los enterococos constituyen una causa muy importante de infecciones en el ambiente hospitalario fundamentalmente endocarditis, infecciones del tracto urinario y biliar, septicemia, infecciones de heridas y meningitis. Más concretamente, los enterococos constituyen el tercer agente nosocomial más frecuente y son responsables del 12% de todas las infecciones hospitalarias (Yuen y Ausubel, 2014). Entre los factores que contribuyen al éxito de los enterococos como patógenos oportunistas se encuentran su facilidad para adquirir (y diseminar) resistencias a antibióticos y factores de virulencia, su resistencia a condiciones medioambientales adversas (p. ej., desinfectantes hospitalarios) y su capacidad para formar biofilms (Hollenbeck y Rice, 2012).

Los enterococos actúan, generalmente, como microorganismos patógenos oportunistas, afectando a individuos particularmente sensibles por su edad (fundamentalmente, niños recién nacidos y ancianos) o cuyas defensas están debilitadas como resultado de disfunciones del sistema inmune, quimioterapia o daño tisular. Los enterococos también afectan a pacientes sometidos a tratamientos prolongados con antibióticos, aunque los microorganismos implicados no son generalmente de origen alimentario (Salminen et al., 1998; Adams, 1999; Franz et al., 2010).

De especial relevancia resulta el fenómeno de resistencia de *E. faecium* a los antibióticos utilizados en medicina humana y producción animal. Además de las resistencias intrínsecas propias de esta especie, es decir, resistencia a estreptogramina B y aminoglucósidos y resistencia a  $\beta$ -lactámicos características de los *E. faecium* del clado A, también se ha descrito la presencia de determinantes genéticos móviles que confieren resistencia a aminoglucósidos,  $\beta$ -lactámicos, glicopéptidos, fenicoles, tetraciclinas, oxazolidinona-lincosamidas-pleuromutilinas-estreptogramina A y macrólidos-lincosamidas-estreptograminas en enterococos de diversos orígenes, incluyendo los procedentes de animales de abasto y diversos alimentos (Arias y Murray, 2012; Hollenbeck y Rice, 2012; EFSA, 2013). La resistencia adquirida de las cepas de *E. faecium* a la vancomicina, consecuencia de la alteración de la ruta biosintética del peptidoglicano que actúa



como diana del antibiótico, es una de las más preocupantes debido tanto a su diseminación a nivel mundial como a su posible transferencia tanto a *Staphylococcus aureus*, especialmente a las cepas resistentes a meticilina o MRSA (del inglés, *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) como a otros patógenos (Willems et al., 2005). Por otra parte, la resistencia a la ampicilina, que confiere resistencia cruzada a la piperacilina y cefalosporinas, es característica de los aislados de *E. faecium* del clado A. En este sentido, se ha descrito que existen dos formas alélicas de la proteína Pbp5 asociada a la proteína 5 de unión a la penicilina y responsable de la resistencia a  $\beta$ -lactámicos, la forma pbp5-S en cepas de origen ambiental o alimentario y, la forma pbp5-R más frecuente en las cepas de origen clínico con valores de CMI (concentración mínima inhibitoria) para este antibiótico menores o mayores a 4 mg/L, respectivamente (Galloway-Peña et al., 2011). Por este motivo, entre las características que la EFSA considera que discriminan las cepas seguras de *E. faecium* de aquellas que podrían causar infección en las personas se encuentra la de su sensibilidad/resistencia a la ampicilina, habiéndose establecido que las cepas seguras de *E. faecium* deben mostrar una CMI  $\leq 2$  mg/L para la ampicilina (EFSA, 2012a,b).

## II.2. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE SÍNTESIS RIBOSOMAL

Los péptidos antimicrobianos se clasifican como péptidos de síntesis ribosomal o no ribosomal. Los péptidos antimicrobianos no ribosomales se incluyen en el grupo de los antibióticos tradicionales, se sintetizan por rutas enzimáticas complejas y se denominarán antibióticos a lo largo del texto. Sin embargo, los péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal (PAMs/PDHs, a lo largo del texto) son producidos por células eucariotas de organismos superiores, forman parte de la defensa natural del hospedador y, además de su actividad antimicrobiana algunos manifiestan propiedades antifúngicas, antivirales, antiparasitarias, inmunomoduladoras y antitumorales. La mayoría de los PAMs/PDHs son codificados por genes. No obstante, también se conoce de la existencia de péptidos bioactivos, derivados de la hidrólisis de proteínas complejas por enzimas proteolíticas, que también manifiestan actividad antimicrobiana (p. ej., lactoferricina). La mayoría de PAMs/PDHs de síntesis ribosomal poseen una longitud variable (10-100 aminoácidos), carga neta positiva y una estructura anfipática que les permite interactuar con la membrana de las células sensibles. Su espectro de acción viene determinado por su secuencia aminoacídica y su estructura molecular.

Aunque los PAMs/PDHs tienen en común con los antibióticos su capacidad para inhibir el desarrollo de determinados microorganismos, manifiestan diferencias significativas en su composición, síntesis, espectro antimicrobiano, modo de acción, mecanismos de inmunidad, resistencia y/o toxicidad (Cleveland et al., 2001; Nes et al., 2002; Gillor et al., 2005) (Tabla II.3).

Tabla II.3. Diferencias entre péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal y los antibióticos

	Péptidos antimicrobianos ribosomales	Antibióticos
<b>Naturaleza</b>	Proteína	Variable, a veces proteica
<b>Síntesis</b>	Ribosomal, generalmente como precursores inactivos Metabolitos primarios	No ribosomal (complejos multi-enzimáticos) Metabolitos secundarios
<b>Espectro de actividad antimicrobiana</b>	Variable Los PAMs producidos por procariotas suelen manifestar un espectro antimicrobiano reducido (especies relacionadas filogenéticamente); PAMs producidos por eucariotas, un mayor espectro de acción	Variable Afectan a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y a células eucariotas
<b>Modo de acción</b>	Generalmente mediante la formación de poros en la membrana citoplasmática En ocasiones, inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, proteínas, ADN y ARN	Inhiben diversas funciones celulares ( <i>e.g.</i> , síntesis de la pared bacteriana, proteínas, ADN y ARN)
<b>Requerimientos para la interacción con la célula diana</b>	En ocasiones, receptores específicos o de anclaje (que facilitan su interacción con las dianas celulares de las células sensibles)	Receptores específicos
<b>Inmunidad de la célula productora</b>	Genes que sintetizan proteínas de inmunidad en procariotas. No descrita en eucariotas	No descrita
<b>Resistencia/tolerancia</b>	Mutaciones en receptores específicos o de anclaje Modificaciones en la composición de la membrana lipídica	Genes de resistencia específicos y transferibles, transportadores de resistencia; múltiples fármacos, mutaciones en las dianas celulares
<b>Toxicidad/efectos colaterales</b>	No descritos	Variables (p. ej., diarreas, reacciones alérgicas y fotosensibilización)
<b>Aplicación</b>	Alimentos <sup>a</sup> y clínica	Clínica

<sup>a</sup>La aplicación de las bacteriocinas como bioconservantes alimentarios únicamente se ha propuesto para las producidas por las bacterias lácticas (BAL), habiéndose autorizado internacionalmente la nisina como aditivo alimentario. Adaptado de Cleveland et al., (2001) y Nes et al., (2002).

### II.2.1. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS PRODUCIDOS POR PROCARIOTAS

Los péptidos antimicrobianos producidos por procariotas son compuestos de síntesis ribosomal, con o sin modificaciones postraduccionales, producidos y secretados por bacterias Gram-positivas (bacteriocinas) y Gram-negativas (colicinas y microcinas) (Joerger et al., 2000; Gálvez et al., 2007; Nishie et al., 2012; Cotter et al., 2013). Se piensa que el 99% de las especies bacterianas pueden producir bacteriocinas.

### II.2.1.1. Bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas

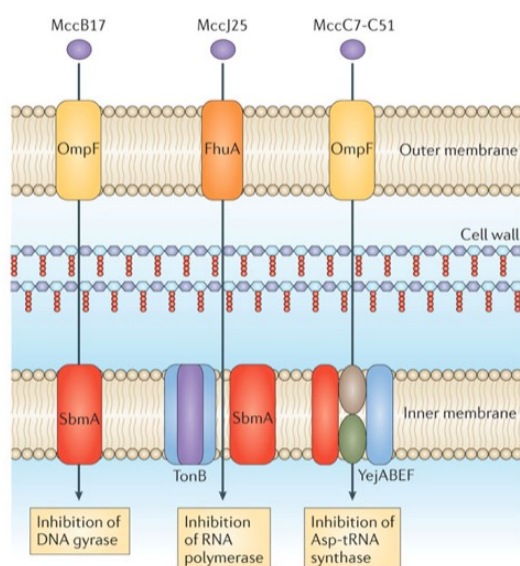
Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas constituyen un grupo heterogéneo de péptidos y proteínas que varían en su tamaño molecular, modo de acción y mecanismo de inmunidad (Riley y Wertz, 2002). Dentro de este grupo, las bacteriocinas producidas por bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* son las mejor caracterizadas, habiéndose clasificado en dos grupos principales: (i) las colicinas, que constituyen el prototipo de bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas y (ii) las microcinas (Pons et al., 2002; Gillor et al., 2005). Por otra parte, las piocinas son bacteriocinas producidas por bacterias del género *Pseudomonas* (Michel-Briand y Baysse, 2002a; Gillor et al., 2005). Finalmente, existe otro grupo de bacteriocinas no bien caracterizadas todavía, entre las que se encuentran la carotovoricina, serracina P y glicinicina A producidas por *Erwinia carotovora* subesp. *carotovora*, *Serratia phymithicum* y *Xanthomonas campestris*, respectivamente, con actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos de las plantas (Jabrane et al., 2002; Pham et al., 2004; Roh et al., 2009; Liu et al., 2013).

Las colicinas son bacteriocinas producidas por *E. coli* con actividad antimicrobiana frente a otras cepas de *E. coli* y *Salmonella* spp. y con un tamaño molecular de 25–80 kDa (Riley y Wertz, 2002; Papagianni, 2003; Gillor et al., 2005; Cascales et al., 2007). Las colicinas se producen en situaciones de estrés y su síntesis es, generalmente, letal para la célula productora. Asimismo, en las colicinas se observan tres dominios proteicos: N-terminal, central y C-terminal implicados en la translocación de la bacteriocina al interior de las células sensibles, en la interacción con el receptor y en la lisis celular e inmunidad, respectivamente. Los genes que codifican su producción e inmunidad se localizan en plásmidos y están formados por un gen estructural, que codifica la bacteriocina, el gen de inmunidad que codifica una proteína que confiere inmunidad a la célula productora mediante su unión a la colicina y posterior inactivación de ésta, y el gen que codifica una proteína implicada en la liberación de la colicina mediante lisis de la célula productora.

Por otra parte, las microcinas (Mcc) son bacteriocinas producidas, mayoritariamente, por *E. coli* y caracterizadas por: (i) un tamaño molecular relativamente pequeño (<10 kDa); (ii) su producción no es dependiente de una respuesta SOS o global de daño al ADN; (iii) su síntesis no es letal para la célula productora; (iv) se producen y secretan durante la fase de crecimiento exponencial de la célula productora; (v) su modo de acción se basa en la formación de poros en la membrana celular o la desestabilización del potencial de membrana, y (vi) poseen un espectro de acción frente a enterobacterias, más amplio que el de las colicinas. A su vez, las microcinas suelen agruparse en dos clases: (i) clase I, constituida por microcinas de un tamaño molecular de <5 kDa, con modificaciones postraduccionales y que ejercen su actividad antimicrobiana sobre dianas intracelulares (Destoumieux-Garzón et al., 2002), y (ii) clase II, que incluye las microcinas de mayor tamaño molecular (7–10 kDa) y que, a su vez, se subdivide en 2 subclases: clase IIa, integrada por microcinas caracterizadas por la ausencia de modificaciones postraduccionales, la presencia de puentes disulfuro y su actividad sobre la membrana citoplasmática y clase IIb, que incluye microcinas lineales que sufren una modificación postraduccional en su extremo C-terminal (Duquesne et al., 2007; Azpiroz et al., 2009; Budič et

al., 2011). Conviene destacar que las microcinas de la clase IIa comparten algunas propiedades con bacteriocinas de la clase IIa producidas por las BAL, entre las que destacan: (i) su pequeño tamaño molecular; (ii) termorresistencia; (iii) hidrofobicidad; (iv) su síntesis como precursores inactivos (preprobacteriocina); (v) la presencia de extensiones N-terminales del tipo secuencia líder; (vi) su secreción mediante transportadores del tipo ABC (del inglés, *ATP Binding Cassette*); (vii) la ausencia de modificaciones postraduccionales, y (viii) su actividad en la membrana lipídica de las bacterias sensibles (Pons et al., 2002). Sin embargo, no se detectan homologías entre sus secuencias aminoacídicas ni entre las de sus proteínas de inmunidad. Además, las microcinas de la clase IIa no son catiónicas como ocurre con las bacteriocinas de la clase IIa.

Se ha propuesto que las bacteriocinas producidas por las bacterias Gram-negativas, que deben atravesar la membrana interna y externa para alcanzar el exterior, ejercen su actividad en las células sensibles por su interacción con el ADN, ARN o con enzimas del metabolismo proteico. Por ejemplo, la microcina B17 (MccB17) inhibe la ADN-girasa, la MccJ25 inhibe la ARN-polimerasa y la Mcc7-C51 inhibe la ARNt-aspartil sintetasa (Figura 2.2). No obstante, la MccE492 ejerce su actividad mediante la formación de poros en la membrana externa de las células sensibles.



**Figura 2.2. Mecanismo de acción de las microcinas.** Fuente: Cotter et al., (2013).

#### II.2.1.1.1. Microcina V/Colicina V

La microcina V (MccV) se describió por primera vez como “factor V” para, más tarde, denominarse colicina V y, finalmente, microcina V. También se conoce que su síntesis, secreción e inmunidad se encuentran reguladas por 4 genes plasmídicos: *cvaA*, *cvaB*, *cvaC* y *cvaI* frecuentes en cepas entéricas virulentas de *E. coli* (Fath et al., 1994). El gen *cvaC* codifica un prepéptido de 103 aminoácidos con una extensión N-terminal del tipo doble glicina, típica de las bacteriocinas de la clase IIa producidas por las BAL, y del que se libera la forma activa de la microcina o péptido maduro de 88 aminoácidos (Håvarstein et al., 1994). Su secreción está

mediada por un transportador ABC-dedicado y una proteína accesoria codificados por los genes *cvaA*, *cvaB* y por un tercer gen, *tolC*, que codifica una proteína de la membrana externa. El gen *cvaI* codifica una proteína de inmunidad de 78 aminoácidos que protege a la célula productora de la MccV. También se ha propuesto que la forma activa de la MccV contiene un enlace disulfuro entre las cisteínas de las posiciones 76 y 87 que puede jugar un papel relevante para su actividad antimicrobiana, como ocurre en las bacteriocinas de la clase IIa (Richard et al., 2006). Su espectro de acción, al igual que el de otras microcinas, es reducido y su actividad antimicrobiana se manifiesta, solamente, frente a especies cercanas.

#### **II.2.1.2. Bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas: bacteriocinas producidas por bacterias lácticas (BAL)**

Aunque numerosas bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus* spp. (Bastos et al., 2009; Duarte et al., 2013) y *Listeria* spp. (Kalmokoff et al., 2001) son productoras de bacteriocinas con actividad antimicrobiana frente a otras bacterias, durante los últimos años se ha producido un extraordinario interés en la identificación y caracterización de bacteriocinas producidas por BAL. Ello puede deberse a que la mayoría de las BAL son reconocidas como GRAS/QPS lo que facilitaría su posible utilización como cultivos iniciadores, protectores y probióticos en los alimentos, así como por la posible utilidad de las bacteriocinas producidas como conservadores naturales de los alimentos y/o como agentes terapéuticos en medicina humana y veterinaria y en producción animal. Los estudios realizados hasta ahora también han permitido determinar muchas de sus características físico-químicas, modo de acción, localización de sus determinantes genéticos y los mecanismos de biosíntesis, procesamiento, secreción, inmunidad y regulación de su producción (Cintas et al., 2001; Nes et al., 2002; Skaugen et al., 2003; Cotter et al., 2005; Deegan et al., 2006; Nishie et al., 2012; Nes et al., 2012).

##### **II.2.1.2.1. Clasificación**

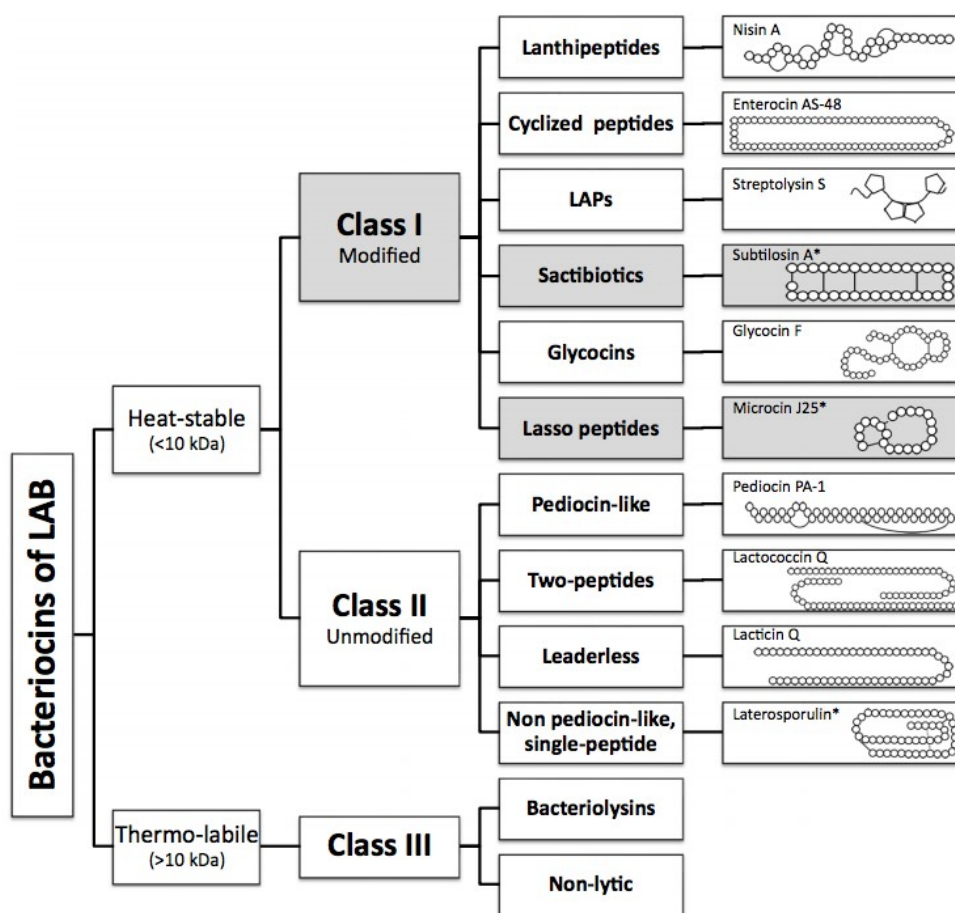
Aunque existen numerosas discrepancias para clasificar las bacteriocinas, debido tanto a su diversidad bioquímica como a los criterios seleccionados para su clasificación, en este trabajo seguiremos la clasificación de bacteriocinas propuesta por diversos autores (Nes et al., 1996; Diep y Nes, 2002; Skaugen et al., 2003; Drider et al., 2006; Nishie et al., 2012) y que se describe a continuación:

**1. Clase I (lantibióticos).** Bacteriocinas de pequeño tamaño molecular (<5 kDa), termoestables y con aminoácidos resultantes de modificaciones postraduccionales como: (i) deshidratación de la serina (Ser) y treonina (Thr) con la consiguiente formación de deshidroalanina (Dha) y deshidrobutirina (Dhb), respectivamente, y (ii) condensación de la Dha y Dhb con grupos sulfhidrilo de residuos de cisteína (Cys) cercanos, lo que origina la formación de lantionina (Lan) y  $\beta$ -metil-lantionina (MeLan), respectivamente (Twomey et al., 2002; Chatterjee et al., 2005; Knerr y van der Donk, 2012). El prototipo de las bacteriocinas de esta clase es la nisina A (NisA), la bacteriocina mejor caracterizada hasta la fecha y la única aceptada internacionalmente como aditivo alimentario para determinados alimentos (Delves-Broughton et al., 1996; Cheigh y Pyun, 2005; Healy et al., 2013).

**2. Clase II** (no lantibióticos). Bacteriocinas de pequeño tamaño molecular (<10 kDa), termoestables, con un punto isoelectrico elevado (pI 8–11) y sin aminoácidos modificados postraduccionalmente (Nes y Holo, 2000; Drider et al., 2006; Nissen-Meyer et al., 2009; Kjos et al., 2011). A su vez, las bacteriocinas de la clase II se han clasificado como:

- a. **Clase IIa** (bacteriocinas del tipo de la pediocina). Bacteriocinas con una potente actividad anti-*Listeria* y elevada homología aminoacídica (40–60%) especialmente en la región N-terminal, en la que se localiza la secuencia consenso conservada YGNGVXCXCXV (donde X representa un residuo aminoacídico no conservado) y con dos residuos de cisteína (C) que forman un puente disulfuro esencial para su actividad antimicrobiana (Ennahar et al., 1999, 2000; Fimland et al., 2005; Drider et al., 2006; Cui et al., 2012). El espectro de acción de las bacteriocinas de esta clase es muy amplio e incluye tanto a otras BAL como a microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos (*Bacillus* spp., *Brochothrix* spp., *Clostridium* spp., *Listeria* spp. y *Staphylococcus* spp.). Incluso se ha descrito actividad antiviral en alguna de las bacteriocinas de esta clase (Wachsman et al., 1999).
- b. **Clase IIb** (sistema de dos péptidos). Bacteriocinas cuya actividad antimicrobiana total depende de la acción complementaria de dos péptidos como la enterocina 1071 (Ent1071A y Ent1071B) o la enterocina X (EntXA y EntXB) (Garneau et al., 2002; Oppegård et al., 2007; Nissen-Meyer et al., 2010).
- c. **Clase IIc** (bacteriocinas circulares). Bacteriocinas con una estructura cíclica resultante de la formación de un enlace peptídico covalente entre las regiones N- y C-terminal de la molécula y que no presentan aminoácidos modificados postraduccionalmente como la enterocina AS-48, circularina A, gassericina A, reutericina 6 y garvicina ML (Kawai et al., 2004; Martín-Platero et al., 2006; Borrero et al., 2011a). No obstante, algunos investigadores proponen que las bacteriocinas circulares por sus características tan diferenciadas de las demás, deberían constituir una clase IV o V (Kemperman et al., 2003; Heng et al., 2006; Maqueda et al., 2008).
- d. **Clase IId** (bacteriocinas no incluidas en los grupos anteriores). Se trata de bacteriocinas termoestables de pequeño tamaño molecular que no se incluyen en ninguna de las clases anteriores como la carnobacteriocina A (Quadri et al., 1995), enterocina B (Casaus et al., 1997), enterocina Q (Cintas et al., 2000b) y bacteriocinas, sintetizadas sin una secuencia líder o péptido señal, como la enterocina L50 (EntL50A y EntL50B) (Cintas et al., 1998a).

Finalmente, una hipotética clasificación de bacteriocinas de la **clase III**, apoyada por algunos investigadores, englobaría a las bacteriocinas de elevado tamaño molecular (>30 kDa) y termolábiles, con una subdivisión en bacteriocinas de la clase IIIa, bacteriocinas líticas o bacterolisinas y, clase IIIb, o bacteriocinas no líticas (Heng et al., 2007). Recientemente, Álvarez-Sieiro et al., (2016) han propuesto una nueva clasificación de las bacteriocinas incluyendo bacteriocinas potencialmente identificadas mediante análisis *in silico* y que redistribuye los grupos previamente existentes (Figura 2.3).

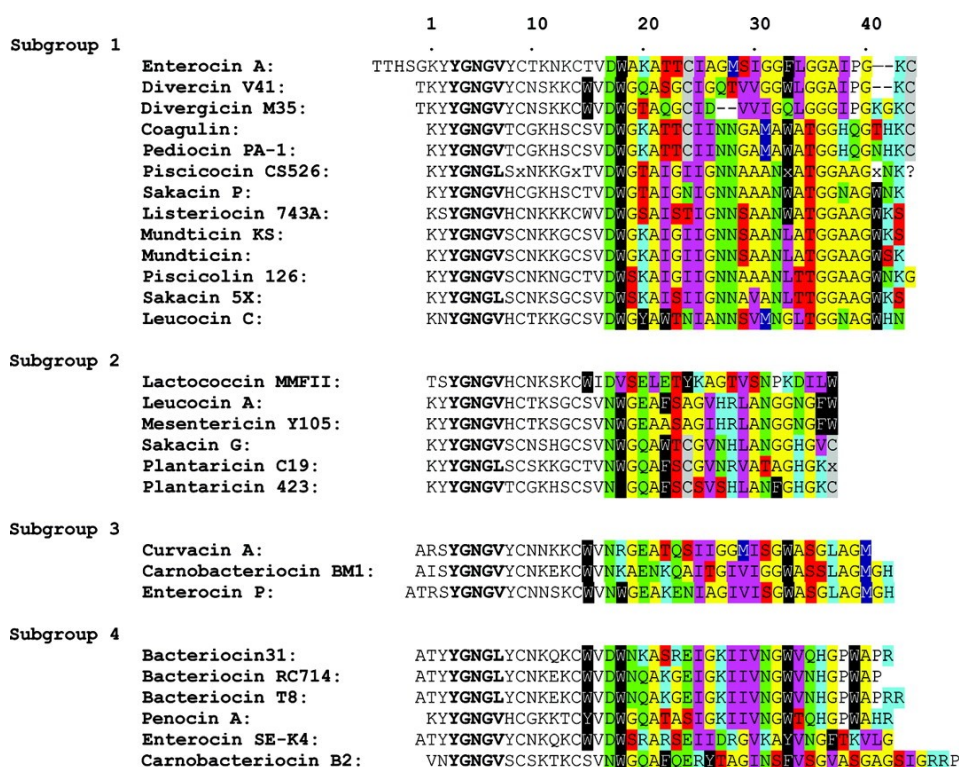


**Figura 2.3. Clasificación de las bacteriocinas propuesta por Álvarez-Siero et al., 2016.**

\* Bacteriocinas no producidas por BAL y detectadas mediante análisis in silico (en gris).

#### II.2.1.2.2. Bacteriocinas de la clase IIa

La pediocina PA-1 (PedA-1) fue la primera bacteriocina caracterizada de la clase IIa (Biswas et al., 1991; Henderson et al., 1992; Nieto Lozano et al., 1992) y, por ello, las bacteriocinas de esta clase se denominan “similares a la pediocina” (del inglés, *pediocin-like*). Las bacteriocinas de la clase IIa son producidas por numerosas BAL y constituyen, posiblemente, el grupo mejor estudiado y más interesante biotecnológicamente de las bacteriocinas de la clase II (Fimland et al., 2005; Drider et al., 2006; Lohans et al., 2011; Cui et al., 2012) (Figura 2.4). Su interés deriva de: (a), su posible uso como aditivos antimicrobianos naturales de los alimentos (b), constituir una alternativa a los tratamientos antibióticos en animales (c), su posible uso en producción animal para reducir o eliminar zoonosis y, finalmente, (d), de su posible utilidad en el diseño y construcción de BAL bacteriocinogénicas utilizables como cultivos iniciadores, protectores o probióticos en la industria alimentaria o como factorías celulares de producción de péptidos antimicrobianos, para su uso en medicina humana y veterinaria (Drider et al., 2006; Deegan et al., 2006; Khan et al., 2010).



**Figura 2.4. Alineamiento de bacteriocinas de la clase IIa en función de la región C-terminal.** La secuencia consenso YGNGV/L de la región N-terminal de muestra en negrita. Haugen et al., 2009.

### II.2.1.2.3. Características estructurales de las bacteriocinas de la clase IIa

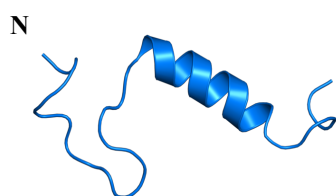
Las bacteriocinas de la clase IIa son péptidos antimicrobianos pequeños (<10 KDa), de entre 37 y 48 aminoácidos, termoestables, con carga neta positiva y un pI de entre 8 y 10. De su secuencia aminoacídica primaria se diferencian dos zonas: (i) la región N-terminal catiónica, hidrofílica y altamente conservada (secuencia consenso YGNGV/L), normalmente, con dos residuos de cisteína unidos por un puente disulfuro y, (ii) la región C-terminal, hidrofóbica y/o anfifílica y de secuencia aminoacídica más variable (Fimland et al., 1996, 2005).

Investigaciones enfocadas a dilucidar la estructura tridimensional (3D) de bacteriocinas de la clase IIa como la leucocina A (LeuA) (Fregeau Gallagher et al., 1997), carnobacteriocina B2 (CbnB2) (Wang et al., 1999), curvacina A (CurA) (Haugen et al., 2005), sakacina P (SakP) (Uteng et al., 2003) y de mutantes de la SakP (Uteng et al., 2003), realizadas por espectroscopía de dicroísmo circular (CD, del inglés *Circular Dichroism*) y por resonancia magnética nuclear (NMR, del inglés *Nuclear Magnetic Resonance*), revelaron que las bacteriocinas se encuentran desestructuradas en agua pero estructuradas en ambientes hidrofóbicos (Nissen-Meyer et al., 2009). De los resultados obtenidos puede decirse que la región N-terminal de las bacteriocinas de la clase IIa adopta una estructura en lámina-β estabilizada por un enlace disulfuro, mientras la región C-terminal presenta, aunque con algunas excepciones, una estructura a modo de horquilla que consiste en una hélice-α anfipática (desde el residuo 18 hasta el 33, aproximadamente) seguida de una cola C-terminal que se dobla hacia el centro de la hélice-α (Fregeau Gallagher et al., 1997; Uteng et al., 2003) (Figura 2.5). También es posible apreciar una bisagra (del inglés,

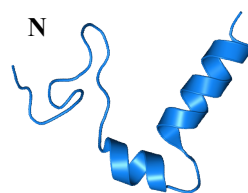


*hinge*) flexible en el aminoácido conservado ácido aspártico (D-17 del subgrupo 1), entre la lámina  $\beta$  de la región aminoacídica N-terminal y la estructura a modo de horquilla de la región aminoacídica C-terminal, con dos dominios proteícos con movilidad independiente (Uteng et al., 2003).

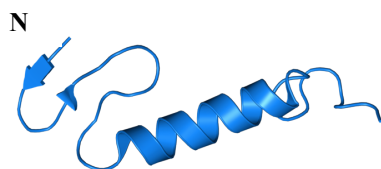
En algunas bacteriocinas de la clase IIa como la EntA, divergicina M35 (DivM35), divercina 41 (Div41), PedA-1, sakacina G (SakG) y plantaricina 423 (Pln423) la estructura a modo de horquilla se estabiliza por medio de un enlace disulfuro entre la cisteína (C) de la mitad de la hélice- $\alpha$  y la C de su región C-terminal. Sin embargo, la mayoría de las bacteriocinas de la clase IIa carecen de dos residuos de cisteína en los lugares descritos y, en su lugar poseen un triptófano (W) central conservado en posición 18 y otro residuo triptófano (W) cerca de la región aminoacídica C-terminal, que juegan un papel predominante en la estabilización de la estructura de las bacteriocinas (Fimland et al., 2002; Nissen-Meyer et al., 2009). Las bacteriocinas del subgrupo 3 y la enterocina SE-K4 (EntSE-K4) así como la carnobacteriocina B2 (CbnB2) del subgrupo 4, carecen tanto del enlace disulfuro como del residuo de triptófano en su extremo aminoacídico C-terminal, siendo difícil asegurar que presenten también una conformación estructural en forma de horquilla. La resolución de la estructura 3D de la CurA (del subgrupo 3) reveló que en su mitad C-terminal adquiere una conformación del tipo hélice-bisagra-hélice que la diferencia de la conformación a modo de horquilla (Haugen et al., 2005). Aun así, ambas estructuras deben ser funcionalmente equivalentes ya que son las encargadas de penetrar en la membrana de las células sensibles (Nissen-Meyer et al., 2009). Conviene destacar que no todas las bacteriocinas de la clase IIa poseen residuos de cisteína (p. ej., acidocina A) y, otras, como la divercina V41 (Div41) o la enterocina A (EntA) poseen dos residuos de cisteína adicionales en su región C-terminal (Nes y Holo, 2000).



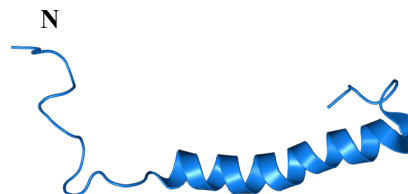
Leucocina A (Gallagher et al., 1997)



Curvacina A (Haugen et al., 2005)



Sakacina P (Uteng et al., 2003)



Carnobacteriocina B2 (Wang et al., 1999)

**Figura 2.5. Estructura tridimensional (3D) de algunas bacteriocinas de la clase IIa.** Fuente: Protein Data Bank in Europe.

#### II.2.1.2.4. Organización genética, biosíntesis y regulación de bacteriocinas de la clase IIa

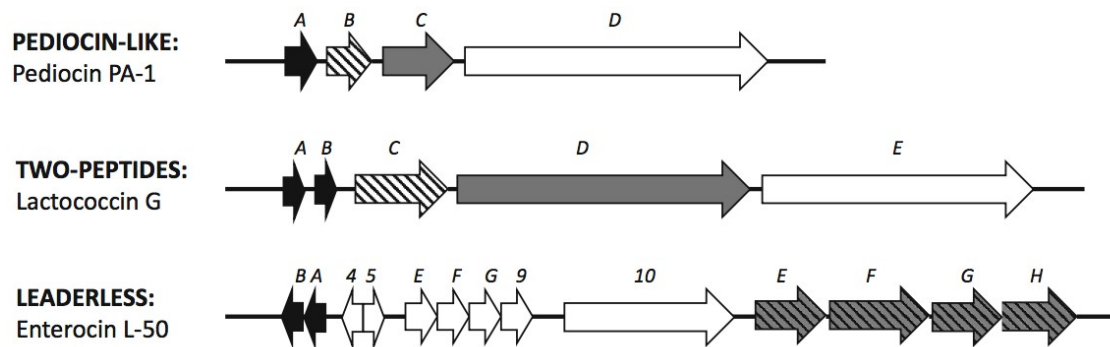
Los determinantes genéticos asociados a la síntesis de bacteriocinas forman agrupaciones génicas (clusters) compuestas por varios genes agrupados en uno, dos o, incluso, tres operones. En el caso de las bacteriocinas de la clase IIa estas agrupaciones génicas constan de los genes que codifican: (i) la preprobacteriocina (gen estructural); (ii) la proteína de inmunidad que protege a la célula productora de la toxicidad de la bacteriocina; (iii) el transportador ABC y (iv) la proteína accesoria esencial para la función de estos transportadores (Sablon et al., 2000; Cintas et al., 2001; Diep y Nes, 2002; And y Hoover, 2003; Skaugen et al., 2003; Nes et al., 2014) (Figura 2.6). Además, la síntesis de bacteriocinas de la clase IIa puede verse afectada por el sistema de transducción de señales *quorum sensing* (dependiente de la densidad celular del cultivo productor), la temperatura, la fuerza iónica o el pH del medio de cultivo (Cintas et al., 1997; Fimland et al., 1998; Leroy y de Vuyst, 1999).

Por lo que respecta a su localización, las agrupaciones génicas implicadas en la síntesis de bacteriocinas pueden localizarse en plásmidos, en el cromosoma o incluso en transposones, aunque conviene destacar que la localización de los genes que codifican una bacteriocina puede variar según la cepa productora.

##### II.2.1.2.4.1. Genes estructurales

La mayoría de genes estructurales que codifican bacteriocinas producidas por BAL codifican precursores biológicamente inactivos (preprobacteriocinas) que contienen una extensión N-terminal y un péptido C-terminal (probacteriocina) que, tras su procesamiento, dará lugar a la bacteriocina madura. Las extensiones N-terminales pueden ser: (i) secuencias líder del tipo “doble glicina” (Gly-Gly) (15–30 aa) reconocidas por transportadores ABC (del inglés, *ATP Binding Cassette*) (Håvarstein et al., 1995), (ii) secuencias líder del tipo FNLDV (23–30 aa), reconocidas también por transportadores ABC (de Jong et al., 2006; Johnsborg y Håvarstein, 2009) o (iii) péptidos señal (SP, del inglés *Signal Peptide*) (18–30 aa) que permiten el procesamiento y la secreción de bacteriocinas por el sistema de procesamiento y secreción Sec-dependiente. Todas las extensiones desempeñan un papel fundamental en el reconocimiento, procesamiento y secreción al medio extracelular de las bacteriocinas.

También se ha sugerido que las extensiones N-terminales: (i) podrían intervenir en la modificación postraducciona de ciertos antibióticos (Skaugen et al., 2003) y (ii) mantienen a las bacteriocinas biológicamente inactivas en el interior de la célula productora, protegiéndola de sus efectos tóxicos (Jack et al., 1995; Nes et al., 1996), si bien se ha descrito que el precursor de la PedAcH/PedPA-1 posee actividad antimicrobiana (Ray et al., 1999). La presencia de extensiones N-terminales en las bacteriocinas sintetizadas tiene implicaciones importantes tanto para su producción, como por su posible utilización para dirigir la producción heteróloga de otras bacteriocinas codificadas con extensiones terminales del tipo doble glicina.



**Figura 2.6. Esquema general de las agrupaciones génicas que codifican bacteriocinas de la clase II.** Gen estructural en negro, gen transportador en gris, gen de inmunidad rayado y otros genes en blanco.

#### II.2.1.2.4.2. Inmunidad

Las proteínas de inmunidad protegen a la célula productora de la actividad antimicrobiana de sus propias bacteriocinas (Johnsen et al., 2005b). El gen de inmunidad suele localizarse en el mismo operón que el gen estructural, de forma contigua y con idéntica orientación, de manera que se expresa concomitantemente con la bacteriocina (Nes et al., 1996). Las proteínas de inmunidad se caracterizan por su pequeño tamaño molecular (51-154 aa) y su elevado pI (7-10), así como por la presencia de posibles segmentos hidrofóbicos transmembrana, lo que sugiere que podrían integrarse en las membranas citoplasmáticas de las células productoras para ejercer su acción protectora (Diep y Nes, 2002; Nes et al., 2012). También se conoce que las proteínas de inmunidad poseen entre 88-115 aminoácidos, una homología en su secuencia aminoacídica de entre el 5-85% y una cierta especificidad por bacteriocinas de la misma clase (Fimland et al., 2005; Johnsen et al., 2005a). De los estudios realizados acerca de la estructura tridimensional de las proteínas de inmunidad de las bacteriocinas CbnB2, EntA y PedA-1 se deduce que, a pesar de que dichas proteínas confieren inmunidad a bacteriocinas de la clase IIa, muy diferentes entre sí, todas ellas comparten básicamente la misma estructura tridimensional (Dalhus et al., 2003; Sprules et al., 2004; Johnsen et al., 2005b; Kim et al., 2007).

Las proteínas de inmunidad de las bacteriocinas de la clase IIa tienen una localización intracelular y a pesar de que son relativamente hidrofóbicas, se distribuyen en la cara interna de la membrana celular desde donde ejercen su modo de acción (Quadri et al., 1995; Dayem et al., 1996). Estudios realizados con bacteriocinas de la clase IIa y proteínas de inmunidad híbridas sugieren que la región C-terminal de la bacteriocina podría interaccionar con la mitad C-terminal de la proteína de inmunidad, quizás a través de la estructura flexible de la cola C-terminal de la proteína de inmunidad (Johnsen et al., 2005b). De todas maneras, todavía no se ha podido demostrar una interacción física directa entre las proteínas de inmunidad y las bacteriocinas (Sprules et al., 2004). No obstante, a la vista de que el dominio C-terminal de las bacteriocinas no parece penetrar completamente en la membrana celular, se ha sugerido que la interacción entre la proteína de inmunidad y la bacteriocina podría ser indirecta y tener lugar mediante la unión de la proteína de inmunidad a la zona interna del receptor de la bacteriocina, bloqueando

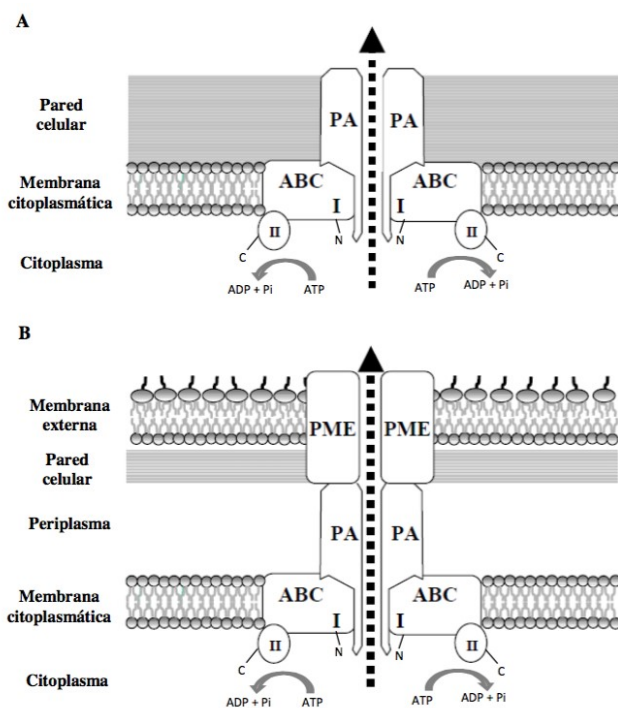
la interacción del receptor con la bacteriocina (Sprules et al., 2004; Fimland et al., 2005; Johnsen et al., 2005b). Finalmente, estudios más recientes han demostrado que las proteínas de inmunidad de las bacteriocinas de la clase IIa interaccionan con proteínas del sistema manosa-fosfotransferasa (Man-PTS), perturbando la unión de la bacteriocina a su receptor (Diep et al., 2007; Kjos et al., 2010).

#### II.2.1.2.4.3. Transporte y procesamiento

Las proteínas extracitoplasmáticas deben transportarse a través de una o varias bicapas lipídicas, hasta alcanzar su destino final. En la mayoría de los casos, estas proteínas se sintetizan como precursores inactivos con una extensión N-terminal del tipo SP, que actúa como lugar de reconocimiento para su transporte, procesamiento y secreción por la Ruta General de Secreción (GSP, del inglés *General Secretory Pathway*) o sistema Sec-dependiente (van Wely et al., 2001; Natale et al., 2008; Yuan et al., 2010). Sin embargo, algunas proteínas y otros compuestos pueden secretarse mediante sistemas específicos como: (i) el sistema de procesamiento por transportadores ABC también denominado sistema de secreción tipo I o sistema de transporte dedicado (DTS, del inglés *Dedicated Transport System*). En lo que se refiere a las bacteriocinas producidas por las BAL, la mayoría se sintetizan con una extensión N-terminal del tipo secuencia líder doble glicina y se secretan por la acción de un transportador ABC y su proteína accesoria, cuyos genes se encuentran generalmente ligados al gen estructural y al de inmunidad (Nes et al., 1996). No obstante, dentro de la clase II también existen bacteriocinas que se sintetizan con una extensión N-terminal del tipo SP, que permite su reconocimiento y secreción a través del sistema Sec-dependiente. A continuación, se describen las características más relevantes de ambos sistemas de procesamiento así como su implicación en la secreción de diversas bacteriocinas.

##### **(A). Procesamiento por transportadores ABC**

Los sistemas de procesamiento por transportadores ABC, presentes en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, se encargan tanto de la internalización como de la secreción de muchos compuestos (p. ej., antibióticos, aminoácidos, péptidos y proteínas, azúcares y bacteriocinas), además de intervenir en numerosos procesos celulares y su regulación (Fath y Kolter, 1993; Dassa y Bouige, 2001; Lorca *et al.*, 2010) (Figura 2.7). Los sistemas de procesamiento y transporte del tipo ABC están compuestos por un miembro de la familia de proteínas transportadoras del tipo ABC, una proteína accesoria de membrana y, en las bacterias Gram-negativas, por una proteína de la membrana externa. (Franke, 1998).

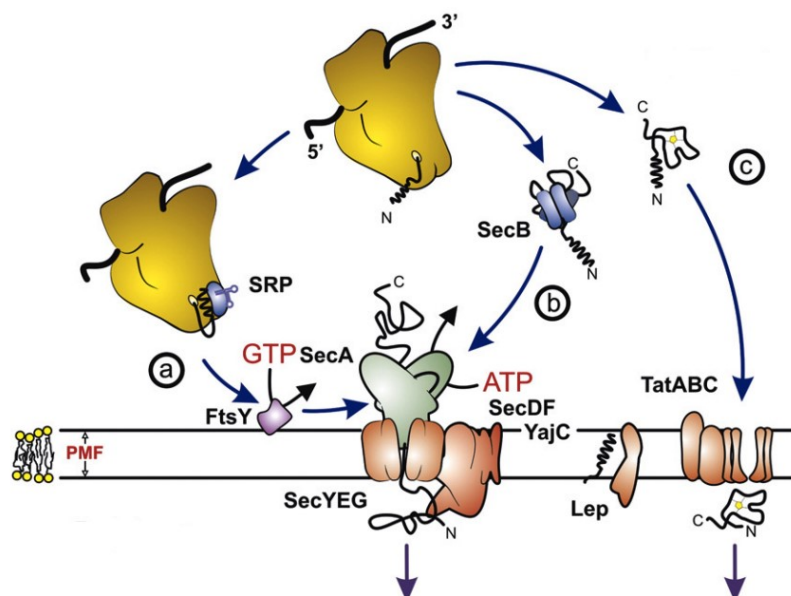


**Figura 2.7. Representación esquemática de un sistema de secreción ABC clásico en bacterias Gram-positivas (A) y Gram-negativas (B).** La proteína transportadora (ABC) consta de un dominio hidrofóbico N-terminal (I), que en la mayoría de los casos contiene seis dominios transmembrana y de un dominio C-terminal (II) que contiene los sitios de unión para el ATP. La proteína accesoria (PA) interacciona con el transportador ABC y en las bacterias Gram-negativas con una proteína de la membrana externa (PME), formando un canal de translocación a través de la membrana citoplasmática y, en su caso, externa. Adaptado de Franke, (1998).

### **(B). Sistema Sec-dependiente o ruta general de secreción**

La principal ruta de translocación de proteínas a través de la membrana citoplasmática bacteriana es el sistema Sec-dependiente, también denominado sistema Sec o ruta general de secreción (GSP, del inglés *General Secretory Pathway*). Los péptidos o proteínas que utilizan esta ruta se sintetizan como precursores con una extensión N-terminal del tipo SP que asegura su correcta aproximación a la membrana citoplasmática (Pugsley, 1993; Driessen y Nouwen, 2008; Natale et al., 2008), se transportan a través de la misma mediante un complejo proteico denominado translocasa y, finalmente, se procesan por la acción de una peptidasa señal antes de ser liberados al medio extracelular (Figura 2.8).

Los SP son extensiones N-terminales de 18-30 aminoácidos que, aunque no presentan homologías en su secuencia primaria, poseen tres dominios proteicos característicos (N, H y C) con propiedades físico-químicas comunes (Fekkes y Driessen, 1999; Mori e Ito, 2001; van Roosmalen et al., 2004). Hasta la fecha, solamente se han descrito unas pocas bacteriocinas producidas por BAL como la acidocina B (Leer et al., 1995), divergicina A (DivA) (Worobo et al., 1994), EntP (Cintas et al., 1997), Lcn972 (Martínez et al., 2000), EnlA (Nilsen et al., 2003), enterocina V583 (Swe et al., 2007) y la hiracina JM79 (HirJM79) (Sánchez et al., 2008), cuyos precursores se sintetizan con extensiones N-terminales del tipo SP. No obstante, la presencia de estas extensiones en las bacteriocinas citadas tiene implicaciones muy importantes, tanto para su propia producción heteróloga por otras BAL como por su posible utilización para la producción heteróloga de otras bacteriocinas codificadas con extensiones terminales del tipo doble glicina (Natale et al., 2008).



**Figura 2.8. Transporte y procesamiento de proteínas mediante la ruta Sec-dependiente.** En las bacterias, los componentes principales de la translocasa Sec son: (i) la proteína periférica de membrana SecA (en verde), que actúa como motor del proceso de translocación mediante la hidrólisis de ATP; (ii) el complejo proteico SecYEG (en marrón), que constituye el canal conductor de los precursores proteicos a través de la membrana; (iii) las proteínas de membrana SecDF y YajC (en marrón) que incrementan la eficiencia del proceso de translocación, y (iv) YidC (en rojo) una proteína implicada en la inserción de proteínas de membrana. Cuando una proteína provista de un péptido señal (SP) emerge del ribosoma puede alcanzar la translocasa postraduccionalmente o simultáneamente a su traducción. En el primer caso, la preproteína se asocia directamente con el núcleo de la translocasa (A) o bien es conducida hacia el mismo por la chaperona SecB (B). En el segundo caso, la preproteína se asocia con la partícula reconocedora de señal (SRP) y, a través de FtsY (en violeta), interacciona con el núcleo de la translocasa (C). Finalmente, la peptidasa señal (SPasa, en naranja) es una proteína de membrana encargada de eliminar el SP del precursor proteico durante o inmediatamente después de su translocación. PMF: Fuerza Protón Motriz (del inglés, *Proton Motive Force*). Adaptado de Natale et al., (2008).

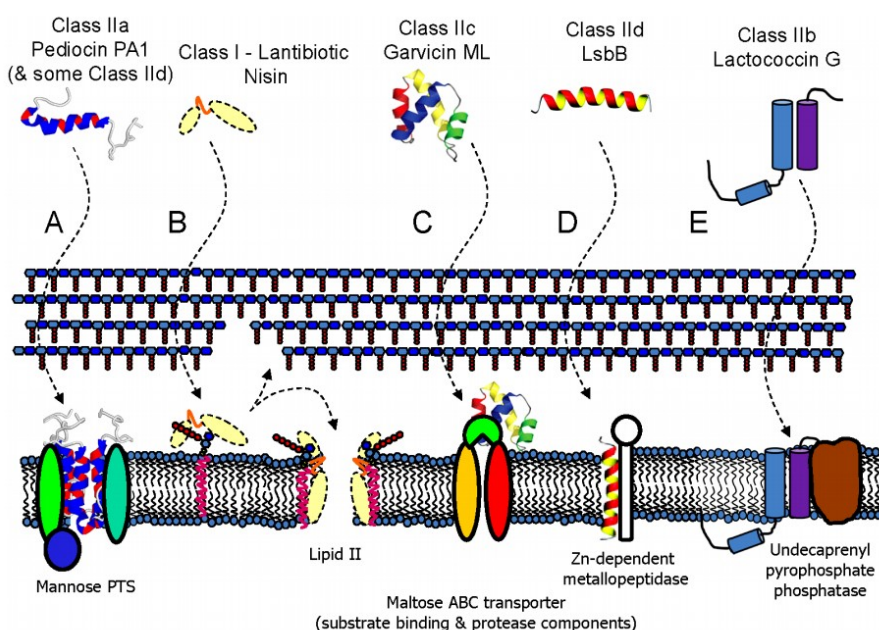
#### II.2.1.2.5. Mecanismo de acción y espectro antimicrobiano

Puede decirse que la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas (clases Ia y II), se debe a la desestabilización funcional de las membranas citoplasmáticas de las células sensibles. Este proceso se desarrolla en tres etapas básicas: (i) unión de la bacteriocina a la membrana; (ii) inserción en la misma y (iii) formación de poros (Montville y Bruno, 1994; Abee, 1995; Moll et al., 1999; Nishie et al., 2012). También se ha hipotetizado que la unión de las bacteriocinas a las membranas citoplasmáticas se encuentra mediada por interacciones electrostáticas entre sus residuos cargados positivamente y los grupos negativos de los fosfolípidos de las membranas bacterianas. Esta unión facilitaría la penetración de la región C- terminal de la bacteriocina en la membrana de las células sensibles. Este mecanismo de acción puede tener lugar gracias a la flexibilidad estructural de la región bisagra que une las regiones aminoacídicas N-terminal y C-terminal de las bacteriocinas de la clase IIa (Nissen-Meyer et al., 2009). Estas observaciones concuerdan con estudios en los que modificaciones aminoacídicas, por mutagénesis *in vitro* de la región C-terminal de algunas bacteriocinas, alteran su especificidad por las células sensibles (Fimland et al., 2000, 2002). No obstante, parece que los dominios N- y C-terminal de las



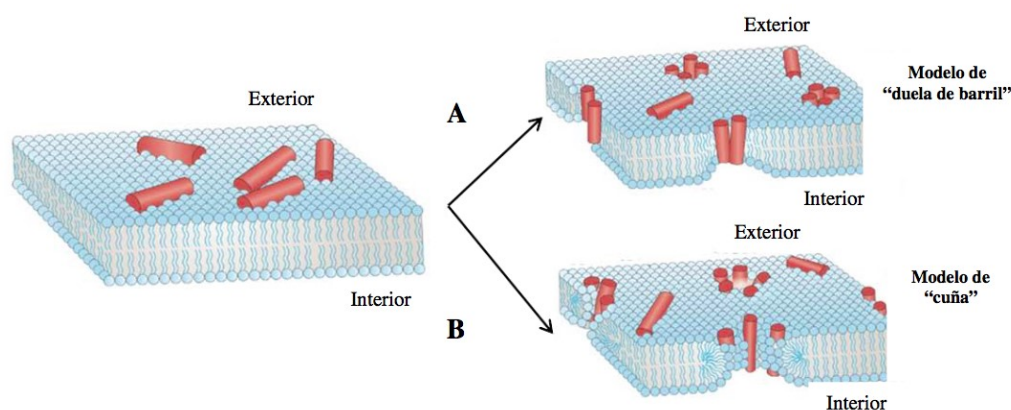
bacteriocinas de la clase IIa funcionan de manera independiente. Algunos estudios han demostrado que bacteriocinas híbridas, derivadas de la fusión de la región N-terminal y C-terminal de distintas bacteriocinas de la clase IIa, son igualmente activas que las bacteriocinas de las que proceden. Las bacteriocinas híbridas son activas frente a las mismas bacterias que las que aportan su región C-terminal, lo que sugiere que su dominio C-terminal es el que determina la especificidad antimicrobiana de las bacteriocinas de la clase IIa (Johnsen et al., 2005a).

Por otra parte, recientemente se han producido avances en la identificación de receptores específicos, localizados en las membranas de las células sensibles, para que las bacteriocinas ejerzan su acción antimicrobiana (Nes et al., 2014) (Figura 2.9). En este sentido, se conoce que algunos antibióticos así como la lactococcina 972 (Lcn972) interaccionan con el lípido II, un precursor de la síntesis del peptidoglicano unido a la membrana citoplasmática que actúa como molécula *docking* o de anclaje, facilitando la interacción de las bacteriocinas con las células sensibles y la posterior formación de poros en las mismas y, por otra parte, como diana de estos péptidos, originando la inhibición de la síntesis de la pared celular (Martin y Breukink, 2007; Martínez et al., 2008; Müller et al., 2012; Münch et al., 2014). De manera similar se ha sugerido que una de las subunidades del sistema fosfotransferasa (PTS, del inglés *Phospho Transferase System*) manosa-específico (EIItMan), puede actuar como receptor de bacteriocinas de la clase IIa así como de otras bacteriocinas de la clase II, entre las que se incluyen la LcnA y LcnB (Diep et al., 2007; Kjos et al., 2011). Más recientemente, se han descrito una proteína transportadora ABC de maltosa, una metalopeptidasa dependiente de Zn y una undecaprenil-pirofosfato fosfatasa (UppP) como receptores específicos de las bacteriocinas GarML, LsbB y LcnG/enterocina 1071 (Ent1071)/lactococcina Q (LcnQ), respectivamente (Gabrielsen et al., 2012; Uzelac et al., 2013; Kjos et al., 2014).



**Figura 2.9. Receptores implicados en el reconocimiento de bacterias sensibles y mecanismo de acción de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas.** A: Componentes del sistema PTS manosa-específico; B: Lípido II; C: Transportador ABC para maltosa; D: Metalopeptidasa dependiente de Zn; E: Undecaprenil- pirofosfato fosfatasa (UppP). Fuente: Cotter et al., (2014).

En lo que respecta a la segunda etapa del mecanismo general de acción de las bacteriocinas, su inserción en la membrana plasmática, se han propuesto dos modelos principales por los que ésta tendría lugar (Abee, 1995; Moll et al., 1999) (Figura 2.10): (i) el modelo de “cuña”, aplicable a nisina A (NisA) y otros lantibióticos, según el cual las moléculas de bacteriocina se sitúan de forma paralela a la membrana, agregan y, posteriormente, se insertan en la membrana, formando un poro en el que también participan los lípidos de la membrana y (ii), el modelo de “duela de barril” aplicable a bacteriocinas de la clase II y algunos péptidos antimicrobianos producidos por eucariotas, según el cual las bacteriocinas se integran en la membrana como monómeros, agregándose posteriormente para establecer estructuras con forma de barril, en las que las cargas hidrofílicas se dirigen hacia la luz del poro y las hidrofóbicas interaccionan con el núcleo hidrofóbico de la membrana. La formación de poros en la membrana posibilita el flujo pasivo de pequeñas moléculas (iones, aminoácidos y ATP), lo que conduce a la disipación de uno o ambos componentes de la fuerza protón-motriz (PMF, del inglés *Proton Motive Force*), un gradiente electroquímico transmembrana necesario para el desarrollo de los procesos metabólicos dependientes de energía, como son el potencial de membrana ( $\Delta\Psi$  y/o el gradiente de pH (Montville y Bruno, 1994; Moll et al., 1999; Drider et al., 2006). La alteración o colapso de la PMF origina una reducción significativa del contenido de ATP intracelular que se hidroliza en un intento vano de reestablecer los gradientes iónicos disipados, lo que impide el transporte activo de nutrientes y el mantenimiento de concentraciones adecuadas de ciertos iones ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Mg^{2+}$ ) y reduce, significativamente, la síntesis de macromoléculas (proteínas y ácidos nucleicos), lo que conduce al cese del crecimiento bacteriano y, en última instancia, determina la muerte celular (Moll et al., 1999; Herranz, 2001). Además, en algunos casos la actividad bactericida de las bacteriocinas se acompaña de la lisis de las células sensibles (bacteriocinas bacteriolíticas como la NisA, plantaricina C y enterococcina EFS2), debido a la entrada masiva de líquidos y el consiguiente choque osmótico (Ojcius y Young, 1991) o a la activación de enzimas autolíticas asociadas a la pared celular bacteriana (Jack et al., 1995; Martínez-Cuesta et al., 2000). Estos mecanismos de acción molecular también se han propuesto para los péptidos antimicrobianos producidos por eucariotas, que se describen más adelante.



**Figura 2.10. Modelos propuestos para la formación de poros en las membranas de las bacterias sensibles, por bacteriocinas.** A: Modelo de “duela de barril” (del inglés, *barrel stave*): los péptidos se insertan perpendicularmente a la membrana y se asocian, formando un poro en el que los péptidos se alinean paralelamente a las cadenas de fosfolípidos; B: Modelo de “cuña” (del inglés, *wedge*): los péptidos se insertan perpendicularmente a la membrana e inducen una curvatura local de las cadenas de fosfolípidos, de manera que la luz del poro resultante está constituida tanto por péptidos como por cabezas de fosfolípidos. Adaptado de Melo et al., (2009).



Se conoce que las bacteriocinas de la clase IIa son muy activas frente a *Listeria* spp., pero también se ha observado que su actividad antimicrobiana se extiende a bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Salmonella* y *Campylobacter* (Ennahar et al., 2000; Svetoch et al., 2008). También se ha determinado que la presencia de un enlace disulfuro en la región C-terminal de algunas bacteriocinas puede incrementar su actividad antimicrobiana y espectro de acción. Cuando Eijssink y col., (1998) evaluaron la actividad antimicrobiana de cuatro bacteriocinas de la clase IIa como la CurA, SakP, PedA-1 y EntA con uno o dos enlaces disulfuro, los resultados obtenidos confirmaron que las bacteriocinas con dos enlaces disulfuro en su región C-terminal (PedA-1 y EntA) poseían una actividad antimicrobiana más elevada y un mayor espectro de acción en comparación con las que poseían un sólo enlace disulfuro en su extremo N-terminal (CurA y SakP), lo que sugiere que la elevada actividad antimicrobiana de la PedA-1 y EntA se debe, al menos en parte, al enlace disulfuro de su región C-terminal (Borrero et al., 2011b; Borrero et al., 2012)

#### **II.2.1.2.5.1. Resistencias**

Conviene destacar que los receptores específicos, descritos hasta ahora para el reconocimiento de las células sensibles por las bacteriocinas, difieren de los receptores o dianas descritas para los antibióticos, por lo que, no parece probable que se desarrollen resistencias cruzadas a ambos tipos de antimicrobianos aunque, no obstante, se han descrito algunos casos (Schmidt et al., 2010; Mehla y Sood, 2011).

Diversos trabajos han descrito que el desarrollo de bacterias sensibles en presencia de bacteriocinas, puede originar la aparición de mutantes resistentes a las mismas (Ming y Daeschel, 1993; Mazzotta y Montville, 1997; Kramer et al., 2006). Estudios encaminados a elucidar los mecanismos implicados en el desarrollo de resistencias a las bacteriocinas han descrito alteraciones en la composición lipídica, contenido de alanina (Ala) y carga iónica de la membrana citoplasmática de las cepas resistentes (Crandall y Montville, 1998; Vadyvaloo et al., 2002; Vadyvaloo et al., 2004; Drider et al., 2006), mutaciones en componentes del sistema PTS manosa-específico que actúan como receptores de bacteriocinas (Dalet et al., 2000; Gravesen et al., 2002; Kjos et al., 2011) y variaciones en la expresión de diversos genes (Kramer et al., 2006). Parece pues, que la resistencia a las bacteriocinas constituye un rasgo multifactorial en el que están implicados, simultáneamente, numerosos mecanismos que parecen ser transitorios, ya que este fenotipo desaparece cuando las células resistentes se desarrollan en un medio de cultivo en ausencia de la bacteriocina (Kok et al., 2005; Kramer et al., 2006).

#### **II.2.2. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS PRODUCIDOS POR EUCARIOTAS**

Los denominados péptidos antimicrobianos producidos por eucariotas (PAMs) o péptidos de defensa del hospedador (PDHs) (PAMs/PDHs) son péptidos evolutivamente conservados de respuesta inmune innata de los organismos eucariotas incluyendo vertebrados, plantas e insectos (Martin et al., 1995; Wang y Wang, 2004). La mayoría de los PAMs/PDHs) manifiestan actividad antimicrobiana a concentraciones micromolares ( $\mu\text{M}$ ) frente a bacterias Gram-

positivas, Gram-negativas, virus, hongos y protozoos pero también son importantes moléculas efectoras de la inmunidad innata (Bowdish et al., 2005; Brown y Hancock, 2006). Dichos péptidos antimicrobianos favorecen la fagocitosis, estimulan la liberación de prostaglandinas, neutralizan el efecto séptico de los lipopolisacáridos, promueven el reclutamiento de células involucradas en la inflamación y angiogénesis y favorecen la reparación del daño tisular (Chan y Gallo, 1998; Yang et al., 2002; Elsbach, 2003; Koczulla et al., 2003).

La mayoría de los PAMs/PDHs son pequeños (10 a 100 aminoácidos), catiónicos debido a un elevado contenido de arginina o lisina, con una carga residual de +2 a +9 y anfipáticos, lo que les permite interactuar con las cargas negativas de las membranas microbianas por su extremo catiónico y penetrar en la fase lipídica gracias a la presencia de aminoácidos hidrófobos en su extremo opuesto como, por ejemplo, a través de grupos fosfato del lipopolisacárido de las bacterias Gram-negativas o de ácidos lipoteicoicos de la superficie de las Gram-positivas (Ganz y Lehrer, 1999; Hancock y Sahl, 2006). Es interesante destacar que existe otro grupo de PAMs/PDHs de carácter aniónico (PAAMs), menos estudiado que los catiónicos producidos por vertebrados, invertebrados y plantas, que también participan en la respuesta inmune innata del hospedador y poseen un amplio espectro de acción (Harris et al., 2009).

Igualmente, para explicar el mecanismo de permeabilización de membrana mediada por los PAMs/PDHs se han propuesto diversos modelos:

- (1) Modelo hoyo de polilla o *carpet*: los péptidos se orientan de forma paralela a la membrana celular por interacciones electrostáticas y actúan como detergentes, rompiendo la membrana mediante la formación de micelas (Pouny et al., 1992; Yamaguchi et al., 2001).
- (2) Modelo duela de barril: descrito también para algunas bacteriocinas (ver sección anterior) (Yang et al., 2001).
- (3) Modelo poro toroidal: los PAMs/PDHs con hélices alfa, unidos a la membrana, se agregan e inducen el plegamiento de los lípidos de membrana estabilizando la formación del poro por las interacciones hidrofóbicas entre las regiones apolares del péptido y las cabezas de los lípidos de membrana. Esto da lugar a la formación de poros con los grupos hidrofílicos orientados hacia el centro del poro. La formación de estos poros transmembrana se ha descrito para magaininas producidas por anfibios, protegrinas de cerdo o la melitina de abejas (Matsuzaki et al., 1996; Yang et al., 2001; Hallock et al., 2003).
- (4) Modelo de agregación: los péptidos se orientan en el espacio de membrana en forma de agregados formando complejos de péptidos y lípidos, parecidos a una micela, pero sin adoptar una orientación en particular (Matsuzaki et al., 1996, 1998; Wu et al., 1999).
- (5) Electroporación molecular: algunos péptidos inducen un potencial electrostático en la bicapa membranosa, que es suficiente para la formación del poro.

- (6) Bases lipídicas o *sinking raft*: los péptidos anfipáticos pueden causar una deformación (hundimiento) de las balsas lipídicas en la bicapa lipídica, formándose poros transitorios letales para los microorganismos (Miteva et al., 1999; Pokorny y Almeida, 2004).

Asimismo, en función de su efecto en la membrana lipídica existen péptidos permeabilizadores, que generan poros en la membrana o no permeabilizadores, que actúan inhibiendo procesos metabólicos como la síntesis de ADN o reducción en la síntesis de proteínas (Boman et al., 1993). Otros péptidos, como la buforina II atraviesan la membrana citoplasmática directamente, sin la formación de poros, y alcanzan el citoplasma donde se acumulan (Park et al., 2000).

Los PAMs/PDHs muestran escasa homología en su secuencia primaria y, a grandes rasgos, pueden clasificarse en función de su estructura. Así, existen péptidos con estructuras lineales extendidas (indolicina y pleurocidinas), con estructuras estabilizadas por puentes disulfuro en lámina beta (defensinas y protegrinas), en hélice alfa (cecropinas, dermaseptinas, magaininas y catelicidinas), estructuras mixtas alfa-beta (drosomicina) o péptidos ricos en lisina/arginina, prolina o triptófano. También se han identificado fragmentos peptídicos, derivados de la hidrólisis enzimática de proteínas de mayor número de aminoácidos, como la lactoferricina derivada de lactoferrina I (Gifford et al., 2005) o la casodicina I derivada de caseína humana y ambos con elevada actividad antimicrobiana (Zucht et al., 1995).

Las familias de PAMs/PDHs más conocidas y mejor caracterizadas son las catelicidinas producidas por mamíferos, anfibios y reptiles (Wang et al., 2008; Tsai et al., 2011; Hao et al., 2012)), dermaseptinas y magaininas producidas por anfibios (Morton et al., 2007), cecropinas producidas por insectos (Moore et al., 1996)) y las defensinas, que constituyen el grupo más amplio y conocido de PAMs (Ganz, 2003). A continuación se describen aquéllos PAMs/PDHs relevantes para este trabajo de investigación.

### **II.2.2.1. Defensinas**

Las defensinas constituyen una familia de péptidos con actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, hongos y algunos parásitos y virus encapsulados. Actúan por permeabilización de la membrana de las células sensibles pero su modo de acción es todavía incierto (Bals, 2000; Yang et al., 2004; Selsted y Ouellette, 2005). Su producción y expresión puede ser inducible o constitutiva y contribuyen a la respuesta inmune innata del hospedador, además de inducir la respuesta inmune adaptativa y la quimiotaxis celular. Las defensinas producidas por mamíferos son péptidos catiónicos de 18-50 aminoácidos, relativamente ricos en arginina y con un tamaño molecular de 3-6 kDa. Contienen seis residuos de cisteína unidos mediante tres puentes de disulfuro que, según su posición, clasifican a las defensinas en  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\theta$  (Ganz, 2003). Las defensinas humanas alfa y beta, muestran una gran homología aminoacídica con las defensinas producidas por otros mamíferos e insectos. Todas las defensinas se sintetizan como prepropéptidos y su procesamiento depende de su lugar de expresión (Wu et al., 2003). Igualmente, todas ellas adoptan una estructura tridimensional de lámina beta antiparalela, limitada por los residuos de cisteína. Se cree que las  $\alpha$ - y  $\beta$ -defensinas

evolucionaron a partir de un gen de  $\beta$ -defensinas ancestral mientras que las  $\alpha$ -defensinas parecen más recientes, ya que son más parecidas como grupo y sólo se identifican en los mamíferos.

Las alfa-defensinas muestran enlaces disulfuro entre los aminoácidos Cys1-Cys6, Cys2-Cys4 y Cys3-Cys5 y se sintetizan y producen por leucocitos neutrófilos, células de Paneth del intestino delgado y células epiteliales humanas. Las cuatro alfa-defensinas humanas, originalmente identificadas y aisladas de leucocitos neutrófilos, se denominaron HNP1-4 (péptidos de neutrófilos humanos); sin embargo, las defensinas HD-5 y HD-6 (donde HD significa defensina humana) son producidas por células de Paneth. En las beta-defensinas los enlaces disulfuro se localizan entre los aminoácidos Cys1-Cys5, Cys2-Cys4 y Cys3-Cys6. Las beta-defensinas se producen por células epiteliales humanas y las defensinas HBD-1-4 se han aislado del plasma sanguíneo humano (HBD-1) y de escaras psoriásicas (HBD-2, HBD-3). La defensina HBD-4 no se ha aislado todavía pero se ha identificado genéticamente. Es más, de la secuencia conocida del genoma humano se sugiere que existen, por lo menos 25 beta-defensinas más que aún no se han identificado en tejidos y órganos (Oppenheim et al., 2003). La defensina HBD-1 se expresa constitutivamente por algunos tejidos aunque su expresión puede ser también inducible, mientras que las defensinas HBD-2-4 son inducibles, generalmente como respuesta a estímulos pro-inflamatorios. La HBD-3, de interés en este trabajo se detecta y produce por células epiteliales humanas del tracto respiratorio, genitourinario, de la piel y las amígdalas y, al igual que las otras beta-defensinas, tiene un amplio espectro antimicrobiano. Su actividad bactericida *in vitro* es más potente que la de otras defensinas y con mayor actividad frente a *Staphylococcus aureus* (Dhople et al., 2006).

### II.2.2.2. Catelicidinas

Las catelicidinas son péptidos antimicrobianos catiónicos de longitud, estructura y tamaño variables que se han identificado y detectado en personas, bovinos, caballos, cerdos, ovejas, cabras, pollo, conejos y peces (Kościuczuk et al., 2012). Todas muestran actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Giacometti et al., 1999; Travis et al., 2000), parásitos (Skerlavaj et al., 1999), hongos (Shin et al., 2000) y virus (Tripathi et al., 2015; Currie et al., 2016). Actúan sobre la membrana de los microorganismos sensibles formando poros que originan su lisis y, además, pueden inhibir la síntesis de su ADN. Además de su actividad antimicrobiana y como ocurre con otros PAMs/PDHs, también se ha determinado que participan en la reparación de heridas, como quimiotácticos reclutando células involucradas en procesos inflamatorios y como inductoras de angiogénesis (Ramanathan et al., 2002).

Las catelicidinas se almacenan en los gránulos de los leucocitos neutrófilos y en los macrófagos como precursores inactivos y su forma madura se libera por desgranulación de las células productoras activadas (Zanetti et al., 1991). En concreto, se ha determinado que una elastasa es la responsable de la liberación de catelicidinas bovinas y porcinas (Scocchi et al., 1992; Panyutich et al., 1997; Shi y Ganz, 1998), mientras la proteinasa 3 actúa sobre los precursores inactivos de catelicidinas humanas (Sørensen et al., 2001). No obstante, algunas catelicidinas no ofrecen lugares de corte para estas enzimas y se secretan no procesadas (Ooi et al., 1990;

O'Levy, 1993). Las catelicidinas poseen dos dominios proteicos funcionales, el dominio catelina de la región N-terminal con una elevada homología entre especies y el dominio región C-terminal, que codifica el péptido maduro y es más variable pudiendo adoptar una estructura en hélice alfa u horquilla beta. En algunos casos se ha observado que la región C-terminal de las catelicidinas es rica en residuos de prolina o arginina (Zanetti et al., 1995, 2005).

Las catelicidinas se clasifican en 5 grupos: (1) dodecapéptidos cíclicos con un puente disulfuro, (2) protegrinas porcinas con dos puente disulfuro, (3) péptidos con estructura en hélice alfa, (4) péptidos con un elevado número de triptófanos o de prolinas y argininas, y (5) péptidos cortos dispuestos en tándem. Todas las catelicidinas se codifican por 4 exones cuyos genes se organizan como agrupaciones génicas o clusters. El primer exon codifica el péptido señal, los exones 2 y 3 el dominio catelina y, el exón 4, la catelicidina madura.

### **II.2.2.3. Pleurocidinas: pleurocidina de platija**

Las pleurocidinas son péptidos lineales, catiónicos, de 21-25 aminoácidos producidos, aislados e identificados a partir de peces planos (platijas, gallos y lenguados) (Patrzykat et al., 2003). La primera pleurocidina identificada se obtuvo del mucus epitelial de platija (PleWF, del inglés *winter flounder* y de nombre científico *Pseudopleuronectes americanus*). Su síntesis deriva de una estructura génica de cuatro exones y tres intrones, que codifican un prepéptido precursor de la pleurocidina madura y activa (Cole et al., 1997). Los exones 1 y 2 codifican el prepéptido mientras la PleWF madura está codificada por los exones 2, 3, y 4. Las pleurocidinas aisladas de peces planos muestran una elevada homología en sus secuencias aminoacídicas (Douglas et al., 2001; Patrzykat et al., 2003). En cuanto a su conformación estructural, las pleurocidinas adoptan estructuras anfipáticas en hélice-alfa (Cole et al., 2000; Syvitski et al., 2005) y, al igual, que otros péptidos antimicrobianos ejercen su actividad frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas formando poros en las membranas de las células sensibles (Yoshida et al., 2001). Las pleurocidinas han mostrado también actividad antimicrobiana frente a aislados clínicos humanos de *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* resistentes a tratamiento antibióticos convencionales y frente a *Mycobacterium tuberculosis* (Cole et al., 2000; Burrowes et al., 2004). Además, su actividad antimicrobiana es independiente de la concentración de sales lo que puede ser beneficioso para el tratamiento de la fibrosis quística (Cole et al., 1997). También se ha determinado que la administración de pleurocidina a salmones infectados con *Vibrio anguillarum*, reduce la infectividad y sintomatología clínica de los salmones tratados (Jia et al., 2000).

### **II.2.3. Aplicaciones de los péptidos antimicrobianos**

El incremento de resistencias bacterianas a los antibióticos ha estimulado la búsqueda de otras estrategias antimicrobianas, eficaces para el tratamiento de infecciones humanas y animales. En este contexto, los péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal o no ribosomal podrían constituir una alternativa eficaz a la utilización de antibióticos ya que además de su actividad antimicrobiana, específica o de más amplio espectro, manifiestan otras propiedades biológicas interesantes. Su elevada actividad antimicrobiana a concentraciones mucho menores que los

antibióticos, nanomolar para las bacteriocinas y micromolar para los PAMs/PDHs, es otra circunstancia a considerar. Una mayor producción de dichos péptidos, por hospedadores microbianos homólogos y heterólogos, constituye otra aproximación para la mejora de su empleo, sobre todo, como conservadores naturales de los alimentos. La utilización de probióticos, productores de bacteriocinas y otros péptidos antimicrobianos, en medicina humana y veterinaria y en producción animal constituye otra alternativa a considerar.

### II.2.3.1. Aplicaciones de las bacteriocinas, microcinas y colicinas

#### *Aplicaciones clínicas*

La bacteriocina nisina A (NisA) se ha propuesto, entre otros objetivos, para: (1) el tratamiento de la úlcera péptica causada por *Helicobacter pylori* (Piper et al., 2009a), para (2) la prevención de la mastitis bovina producida por *Streptococcus* spp. y *Staphylococcus* spp., o (3) para el tratamiento de infecciones producidas por *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) y *E. faecalis* resistente a vancomicina (VRE), pero sensibles a NisA, lacticina 3147 (Lcn3147), mersacidina y actagardina producidas por *L. lactis*, *B. subtilis* y *Actinoplanes* spp., respectivamente (Guder et al., 2000; Piper et al., 2009b). *Propionibacterium acnes*, uno de los microorganismos responsables del acné, es sensible a los lantibióticos Lcn3147, epidermina y gallidermina, producidos por *L. lactis*, *S. aureus* y *S. gallinarum*, respectivamente (Ross et al., 1999; Pag y Sahl, 2002; Guinane et al., 2005; Piper et al., 2009a). Asimismo, las bacteriocinas y otros péptidos antimicrobianos pueden ser útiles en colutorios bucales o pastas dentales para la prevención de la caries dental y como tratamiento de la enfermedad periodontal (Guinane et al., 2005; O'Connor et al., 2006; Islam et al., 2007; Dobson et al., 2011), en la prevención de la faringitis producida por *St. pyogenes* que, además, causa mal aliento (Tagg, 2004; Cotter et al., 2005; Wescombe et al., 2006; Di Pierro et al., 2012) o en el tratamiento de las infecciones pulmonares causadas por *Ps. aeruginosa*, mediante la administración de piocinas (Michel-Briand y Baysse, 2002b; Gillor et al., 2005).

Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas podrían emplearse en la prevención y tratamiento de infecciones producidas por bacterias patógenas entéricas (p. ej., *E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica* y *Campylobacter* spp.). Asimismo, bacteriocinas producidas por *Bacillus* spp. o *Paenibacillus* spp. con elevada actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas podrían emplearse, microencapsuladas, para reducir, en personas y animales, la presencia de bacterias patógenas sensibles a su actividad (Zhao et al., 1998; Gillor et al., 2005; Cole et al., 2006; Diez-Gonzalez, 2007). Además, algunas bacteriocinas han mostrado actividad antiviral. Se ha determinado que la cinamicina, lantioeptina y enterocina CRL35 (EntCRL35) producidas por *Streptomyces* spp., *Streptoverticillium cinnamoneum* y *E. mundtii* CRL35, respectivamente, inhiben la replicación del virus herpes simple (Wachsman et al., 1999; Ryan et al., 2002), la enterocina ST4V (EntST4V) producida por *E. mundtii* ST4V inactiva diversos virus entéricos (Todorov et al., 2005) y la bacteriocina ST5Ha producida por *E. faecium* ST5Ha, muestra actividad frente al herpesvirus HSV-1 (Todorov y Dicks, 2005).

### ***Bioconservantes de los alimentos***

Las bacteriocinas también podrían emplearse como conservadores naturales de los alimentos o bioconservantes alimentarios en leche, quesos, productos cárnicos, vegetales, pescados, mariscos, ensaladas, alimentos enlatados, ovoproductos, vino, cerveza, bebidas analcohólicas y productos de panadería (O'Sullivan et al., 2002; Työppönen et al., 2003; Vaughan et al., 2004; Cotter et al., 2005; Foulquié Moreno et al., 2006; Gálvez et al., 2007; Basanta, 2007; Calo-Mata et al., 2007; Ndaw et al., 2008; El Bassi et al., 2009; Collins et al., 2010). En este contexto, se ha prestado especial atención a las bacteriocinas producidas por BAL por su status GRAS/QPS. Además de su naturaleza peptídica que hace que puedan inactivarse por las enzimas proteolíticas del tracto GI, las bacteriocinas no son inmunógenas, poseen un amplio espectro de acción y resisten tratamientos como la pasteurización, liofilización o acidificación. No obstante, la única bacteriocina autorizada en la UE como bioconservante alimentario es la nisina A (conservante E-234) en determinados tipos de quesos, productos lácteos y postres.

Generalmente, existen cuatro estrategias para la aplicación de las bacteriocinas como bioconservantes alimentarios: (i) inoculación del alimento con la bacteria láctica (BAL) bacteriocinogénica para que produzca la bacteriocina *in situ* (cultivo iniciador y/o protector); (ii) adición de un medio fermentado por una cepa bacteriocinogénica (ingrediente alimentario); (iii) adición de la bacteriocina, parcialmente purificada o purificada a homogeneidad (aditivo alimentario), y (iv) incorporación o inmovilización de la bacteriocina en el material de envasado de los alimentos, con el fin de desarrollar un envase activo (Abee, 1995; Holzapfel et al., 1995; Cotter et al., 2005).

### ***Otras aplicaciones***

Además de las aplicaciones previamente descritas también se ha propuesto la utilización de las bacteriocinas como (1), aditivos antimicrobianos en los piensos para animales (Kalmokoff et al., 1996; Giraffa et al., 2010; Diez-Gonzalez, 2007; Lima et al., 2009), (2) para el tratamiento de aguas residuales procedentes de granjas (purines) (Lauková y Czikková, 1998), en el (3) tratamiento de semillas para evitar la incidencia de *E. coli* O157:H7 en brotes de alfalfa (Nandiwada et al., 2004), como (4) conservadores antimicrobianos naturales de cosméticos y desodorantes (p. ej., mediante el empleo de gallidermina) (Cotter et al., 2005), en la (5) prevención de la colonización de catéteres por bacterias Gram-positivas y *E. coli* mediante el empleo de NisA y colicinas, respectivamente (Bower et al., 2002; Gillor et al., 2005; Trautner et al., 2005), y como (6) tratamiento y prevención de infecciones bacterianas en vegetales, ya que algunas bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas (p. ej., piocinas) inhiben a bacterias patógenas responsables de infecciones vegetales que reducen su productividad Gillor et al., 2005.

Por último, ya que además de su actividad antimicrobiana algunas bacteriocinas manifiestan otras actividades biológicas se ha propuesto su empleo, entre otros, con los siguientes objetivos:

1. Inmunopotenciación del sistema inmune (Mills et al., 2011).

2. Tratamiento anticonceptivo y espermicida (Aranha et al., 2004; Reddy et al., 2004; Cotter et al., 2005; Silkin et al., 2008).
3. Como agentes potencialmente anticancerígenos debido a la capacidad de algunas bacteriocinas (p. ej., piocinas, colicinas y microcinas) de inhibir el crecimiento de células eucariotas mediante la inducción de la apoptosis o muerte celular programada de las células cancerígenas (Hetz et al., 2002; Gillor et al., 2005; Lagos et al., 2009; Shaikh et al., 2012).

El potencial terapéutico de las bacteriocinas también podría explotarse mediante la administración de cepas probióticas que produzcan las bacteriocinas naturalmente o mediante su modificación genética permitiendo, en este último caso, el diseño de probióticos con actividades antimicrobianas predeterminadas.

### II.2.3.2. Aplicaciones de los péptidos antimicrobianos producidos por eucariotas

El potencial terapéutico de los PAMs/PDHs producidos por células eucariotas también es amplio. En pacientes con quemaduras graves se ha demostrado la pérdida de la capacidad de producción de defensinas en la piel afectada por lo que, en estos pacientes, las infecciones recurrentes son comunes y, en ocasiones, se convierten en complicaciones mortales. Se ha observado que, en estos pacientes, la aplicación de defensinas por vía tópica disminuye hasta un 90% las infecciones recurrentes además de que la aplicación de péptidos antimicrobianos induce una mejor cicatrización debido a que algunos como las beta-defensinas pero, sobre todo, la catelicidina LL-37 estimulan la proliferación de células epiteliales (Nizet et al., 2001). Otros estudios han demostrado que la infección por *Helicobacter pylori* no solamente induce la expresión de beta-defensina 2 sino que, además, dicha bacteria es muy sensible a su actividad antimicrobiana. También se han formulado hipótesis acerca de la existencia de un factor celular antiviral denominado CAF (del inglés, *CD8 Antiviral Factor*) que se piensa que hace resistentes a algunos individuos a la infección por el virus VIH (virus de la Inmunodeficiencia Humana). Esto ha dado lugar a investigaciones para la utilización de defensinas en pacientes infectados con el virus VIH (Zhang et al., 2002; Chang y Klotman, 2004).

Además de su actividad antimicrobiana en bacterias resistentes a antibióticos, los PAMs/PDHs podrían revertir estas resistencias mediante, al menos, dos mecanismos: (i) en bacterias Gram-negativas la destrucción de la membrana externa facilitaría el acceso de otros fármacos a sus dianas intracelulares y b), los PAMs/PDHs causan depleción del ATP intracelular de las bacterias sensibles impidiendo la expulsión de fármacos por sistemas de transporte dependientes de energía.

Otra de las posibles aplicaciones de los PAMs/PDHs sería como elementos de terapia génica antiinfecciosa. La aplicación de hCAP18/LL37 a explantes de epitelio respiratorio de pacientes con fibrosis quística incrementa de tres a cuatro veces los niveles de LL-37 y permite recuperar la actividad bactericida perdida (Bals et al., 1999a). Ratones infectados con adenovirus pero expresando el gen productor del péptido antimicrobiano hCAP18/LL37 mostraron una



supervivencia muy superior frente a neumonía por *P. aeruginosa* o septicemia por *E. coli*, que los que no expresaban dicho gen (Bals et al., 1999b).

Otro ejemplo de terapia génica sería la expresión inducible en ratones transgénicos de Shiva 1, un análogo de la cecropina bajo el promotor de la interleukina 2 (IL-2), lo que permite manipular, de forma externa o como producto de la infección la expresión de cecropina, evitando daños patológicos o incluso el desarrollo de autoinmunidad frente a dicho péptido. Dichos ratones se mostraron altamente resistentes a la infección por *Brucella abortus* (Reed et al., 1997).

Los PAMs/PDHs también se han propuesto como componentes de biomateriales utilizados en prótesis o implantes óseos (Costa et al., 2011). En este contexto, histatinas salivales humanas han mostrado su eficacia en resinas dentales de polimetilmetacrilato como mecanismo de prevención frente a infecciones por *Candida* spp. (Yoshinari et al., 2006).

#### **II.2.4. Diseño de genes sintéticos que codifican la síntesis de bacteriocinas**

El diseño de genes sintéticos, deducidos de la secuencia aminoacídica conocida de bacteriocinas descritas, consituye una herramienta útil para la síntesis, producción y expresión funcional de bacteriocinas por otros microorganismos hospedadores o productores cuando la secuencia nucleotídica que codifica una bacteriocina no se encuentra disponible o la bacteria que la produce naturalmente es difícil de conseguir (Chang et al., 2006; Denis-Quanquin et al., 2007). Además, conocer y emplear esta metodología también brinda la oportunidad de diseñar nuevas bacteriocinas o péptidos antimicrobianos no presentes en la naturaleza y con actividad y espectros de actividad antimicrobiana, mayores o más específicos. Igualmente, el diseño de genes sintéticos para la síntesis de bacteriocinas con el codon de uso preferido para la síntesis de proteínas o péptidos por los microorganismos productores seleccionados facilitaría el procesamiento, transporte y secreción de la bacteriocina de interés lo que, a su vez, podría conducir a un incremento en la cantidad de bacteriocina producida, purificada y recuperada (Lin et al., 2002; Öberg et al., 2011; Gao et al., 2012). El diseño de genes sintéticos, deducidos de la secuencia aminoacídica conocida e bacteriocinas ha permitido la síntesis y producción de divercina RV41 (DvnRV41) y de EntA por células recombinantes de *E. coli* (Richard et al., 2004) y por las levaduras *Pichia pastoris* y *Kluyveromyces lactis* (Jiménez et al., 2014).

### **II.3. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS Y OTROS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS**

La producción de bacteriocinas y otros péptidos antimicrobianos por hospedadores procariotas o eucariotas permite el uso de microorganismos productores más seguros, incrementar su producción y dotar de actividad antimicrobiana, mayor o más específica a dichos péptidos. Esta estrategia permite, además, favorecer determinadas modificaciones postraduccionales en el caso de los hospedadores eucariotas y de mejorar los rendimientos de purificación de los péptidos

producidos. El diseño de un sistema eficiente de producción heteróloga de proteínas o péptidos depende de numerosos factores entre los que se incluyen las características del hospedador heterólogo, los elementos genéticos utilizados (p. ej., vector de expresión, región promotora, lugar de unión al ribosoma y señales de transcripción y traducción), las posibles modificaciones postraduccionales de la proteína de interés, el nivel de expresión y localización del producto final, y/o los posibles efectos tóxicos del producto final en el hospedador (Makrides, 1996).

El microorganismo más empleado en la producción heteróloga de proteínas es *E. coli*, debido a ser uno de los organismos mejor caracterizado genéticamente y para el que se han desarrollado numerosas herramientas de manipulación genética. Las BAL constituyen otra alternativa atractiva para la producción de bacteriocinas y otros péptidos antimicrobianos ya que, en su mayoría, se consideran microorganismos GRAS y/o QPS. Diversas especies de levaduras (p. ej., *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Kluyveromyces lactis*) también resultan interesantes como hospedadores para la producción heteróloga de péptidos antimicrobianos ya que, aunque se les aplican las técnicas de manipulación genética de los procariotas, gozan de la versatilidad de los sistemas eucariotas (Gutiérrez et al., 2005; Basanta et al., 2010; Borrero et al., 2012).

### II.3.1. Producción heteróloga de proteínas por levaduras

Las levaduras combinan la facilidad de su manipulación genética y las características de crecimiento de los procariotas, con los mecanismos de modificación postraduccionales de los eucariotas. Igualmente, muchas de ellas se han utilizado como hospedadores heterólogos para la producción de una gran variedad de proteínas y péptidos debido a sus elevados niveles de expresión génica y a que, en muchos casos, poseen promotores potentes y fuertemente regulados (Weinacker et al., 2014). Por ello, se piensa que las levaduras pueden constituir una alternativa interesante a las BAL para la producción heteróloga de bacteriocinas y otros péptidos antimicrobianos producidos por eucariotas.

La primera levadura evaluada como sistema de producción heteróloga de proteínas fue *S. cerevisiae*. Como en el caso de *E. coli*, *S. cerevisiae* es uno de los organismos mejor caracterizados genética y fisiológicamente y, además, su consideración de microorganismo seguro y su empleo habitual en la industria alimentaria en la elaboración de una gran variedad de alimentos como la cerveza, vino, sidra y otras bebidas alcohólicas y productos de panadería, favorece su elección para la producción recombinante de péptidos antimicrobianos. Sin embargo, la utilización de *S. cerevisiae* no siempre se considera ideal para la producción de proteínas recombinantes ya que posee inconvenientes como: (a) su bajo nivel de producción; (b) la inestabilidad de las cepas recombinantes; (c) su alto nivel de glucosilación; y (d) su difícil adaptación a ensayos de tipo industrial (Gellissen et al., 2005). Por ello, ya se han realizado estudios que permiten la producción heteróloga de proteínas y péptidos de interés por otras levaduras como las levaduras metilótrofas *P. pastoris*, *Hansenula polymorpha* y *K. lactis* o las dimórficas *Arxula adeninivorans* y *Yarrowia lipolytica* (Gellissen et al., 2005; Böer et al., 2007).

### II.3.2. Levaduras metilotrofas: *Pichia pastoris*

En 1969, Koichi Ogata describió la capacidad de ciertas levaduras de utilizar metanol como única fuente de carbono y energía y la compañía de petróleo, British Petroleum (BP), optimizó el cultivo de *P. pastoris* en metanol para aprovechar la biomasa de levaduras como fuente de proteína para piensos animales. Sin embargo, con la crisis del petróleo en 1973 la producción de metanol se encareció notablemente y los esfuerzos se centraron en desarrollar *P. pastoris* como un sistema de expresión de proteínas. En 1993, BP cedió la patente de *P. pastoris* como sistema de expresión de proteínas a la compañía Research Corporation Technologies (RCT, Tucson, AZ, EE.UU.) y, posteriormente, la compañía Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, EE.UU.) comenzó a comercializar los componentes del sistema de expresión de proteínas por levaduras basado en la utilización de *P. pastoris* (Cereghino y Cregg, 2000). En 2008, la fusión de Invitrogen y Applied Biosystems originó la creación de Life Technologies que fue más tarde adquirida por Thermo Scientific (Waltham, MA, EE.UU.) en 2014. Independientemente de su distribuidor comercial, el sistema de producción heteróloga de proteínas por *P. pastoris* constituye una herramienta analítica de interés en muchas áreas biológicas de investigación básica y aplicada (Cregg et al., 2013).

De las levaduras metilotrofas, *P. pastoris* es la más utilizada como modelo de producción heteróloga de proteínas. Esta levadura se considera de interés por la facilidad de su manipulación genética, de transformación, de clonación por complementación, de producir elevados niveles de proteínas intracelulares y extracelulares y por las modificaciones posttraduccionales de los péptidos y proteínas producidos como la formación de enlaces disulfuro, glucosilación y procesamiento proteolítico. La utilización de *P. pastoris* como hospedador heterólogo permite obtener buenos resultados de producción de proteínas recombinantes y facilita el escalado de los ensayos de laboratorio a situaciones de tipo industrial (Weinacker et al., 2014; Ahmad et al., 2014).

Otra levadura que ha dado buenos resultados para la expresión producción heteróloga de proteínas a nivel industrial es *Kluyveromyces lactis*, siendo una de las primeras levaduras en las que se estableció un sistema de transformación eficaz (Das y Hollenberg, 1982). A nivel de factoría celular, *K. lactis* es conocida por la producción industrial de la quimosina bovina, enzima utilizada en la industria lechera para coagular la leche en la producción de quesos (van den Berg et al., 1990), siendo ésta la primera enzima producida a bajo coste por un hospedador eucariota. A día de hoy un elevado número de proteínas de bacterias, hongos, virus, plantas y mamíferos se han producido por dicha levadura. Como hospedador, *K. lactis* es de fácil manipulación genética, permite el uso de vectores integrativos y episomales y se conoce la secuencia completa de su genoma (Dujon et al., 2004). Además, se desarrolla en medios de cultivo estándar de levaduras y es una levadura considerada GRAS (van Ooyen et al., 2006).

### II.3.3. El género *Pichia* (*Komagataella*)

El género *Pichia*, recientemente denominado *Komagataella* pertenece al reino *Fungi*, filo o filum *Ascomycota*, clase *Saccharomycetes*, orden *Saccharomycetales*, familia

Saccharomycetaceae y comprende las especies *K. pastoris*, *K. pseudopastoris*, *K. phaffii* y *K. kurtzmanii* (Naumov, 2015).

Esencialmente, la expresión de un gen heterólogo por *P. pastoris* consiste en la: (i) inserción del gen foráneo de interés en un vector de expresión proteica, (ii) integración del vector en el genoma de *P. pastoris*, y (iii) selección de los clones que puedan expresar el gen insertado. Existe una gran variedad de cepas de *P. pastoris* y de vectores de expresión para la producción heteróloga de proteínas y péptidos de interés (Higgins et al., 1998).

La principal característica de *P. pastoris* como productor heterólogo de proteínas es que dirige la expresión de proteínas mediante la utilización de un promotor de elevado nivel de transcripción y altamente regulable, inducido por metanol: el promotor de la enzima alcohol oxidasa o PAOX1 (Inan, 2000; Kim et al., 2013). También hay que destacar que *P. pastoris* se desarrolla en aerobiosis lo que evita la generación de subproductos indeseables típicos de los procesos fermentativos, como el etanol y permite su desarrollo a elevadas densidades celulares (Cregg et al., 2000). Alcanzar elevados niveles de biomasa (100-200 g/L) es muy deseable en la expresión de proteínas asociadas al crecimiento celular (Mattanovich et al., 2012).

En la producción de proteínas heterólogas por *P. pastoris* bajo el control de promotor PAOX1, se define una primera etapa de desarrollo celular en la que se genera una gran cantidad de biomasa mediante la utilización de fuentes de carbono que proporcionan un elevado rendimiento biomasa/substrato, como el glicerol. El glicerol, a su vez, tiene un efecto menos represor sobre el promotor PAOX1 que otras fuentes de carbono como la glucosa, por lo que es el sustrato mayormente utilizado durante esta etapa. Posteriormente, la expresión de proteína se induce mediante el cambio de la fuente de carbono y energía a metanol, lo que implica la activación del promotor PAOX1 y la producción de hasta un 30% de la proteína expresada como proteína soluble total (Cregg et al., 1993).

#### **II.3.4. Promotor de la enzima alcohol oxidasa (PAOX1)**

La enzima alcohol oxidasa es la responsable de la primera de las reacciones de oxidación del metanol por *P. pastoris* y su síntesis se encuentra regulada por el promotor PAOX1. No obstante, existen dos genes responsables de la síntesis de esta enzima, el de la alcohol oxidasa 1 (AOX1) y el de la alcohol oxidasa 2 (AOX2) (Cregg et al., 1989).

La secuencia de nucleótidos que codifican la enzima alcohol oxidasa manifiesta una homología de un 92% entre la AOX1 y AOX2. Asimismo, las enzimas codificadas por cada gen comparten una homología del 95% en su composición aminoacídica y un 97% de actividad enzimática específica (Koutz et al., 1989). Sin embargo, el nivel de transcripción de cada uno de los genes citados ellos es muy diferente. El gen que codifica la enzima AOX1 es responsable de la síntesis del 90% de la enzima AOX1 producida por las células, mientras el gen que codifica la enzima AOX2 produce tan sólo el 10% restante de la enzima AOX2 (Cregg et al., 1989). Las diferencias de producción de ambas enzimas se deben a diferencias nucleotídicas fuera de la región codificante de los enzimas y en la posición 5' - 3' hacia arriba de la región que codifica la forma

madura de las enzimas, es decir, en la región de su promotor (Koutz et al., 1989). Por ello, la mayoría de vectores de expresión proteica diseñados para *P. pastoris* poseen el promotor activo PAOX1 de la enzima AOX1.

No obstante, además del promotor PAOX1 otros promotores se han utilizado y evaluado para la producción heteróloga de proteínas por *P. pastoris* (Tabla II.4).

**Table II.4. Promotores utilizados para la producción heteróloga de proteínas por *P. pastoris***

	Gen	Regulación	Referencia
<b>Inducibles</b>			
AOX1	Alcohol oxidasa	Inducible por MeOH	Tschopp et al., (1987);
DAS	Dihidroxiacetona sintasa	Inducible por MeOH	Ellis et al., (1985);Tschopp et al., (1987)
FLD1	Formaldehído deshidrogenasa	Inducible por MeOH o metilamina	Shen et al., (1998)
ICL1	Isocitrato liasa	Reprimido por glucosa, inducible por EtOH en ausencia de glucosa	Menendez et al., (2003)
PHO89	Transportador simporte Na <sup>+</sup> /fosfato	Inducción en ausencia de fosfato	Ahn et al., (2009)
THI11	Gen de síntesis de tiamina	Reprimido por tiamina	Stadlmayr et al., (2010)
ADH1	Alcohol deshidrogenasa	Reprimido por glucosa y MeOH, inducible por glicerol y EtOH	Cregg et al., (2012)
ENO1	Enolasa	Reprimido por glucosa, MeOH y EtOH, inducible por glicerol	Cregg et al., (2012)
GUT1	Glicerol kinasa	Reprimido por MeOH, inducible por MeOH, glicerol y EtOH	Cregg et al.,(2012)
<b>Constitutivos</b>			
GAP	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Expresión constitutiva por glucosa y, en menor nivel, por glicerol y MeOH	Waterham et al., (1997)
TEF1	Traducción del factor de elongación 1	Expresión constitutiva por glicerol y glucosa	Ahn et al., (2007)
PGK1	3-Fosfato gliceraldehído kinasa	Expresión constitutiva por glucosa y, en menor nivel, por MeOH	de Almeida et al., (2005)
GCW14	Proteína hipotética de anclaje del fosfatidilinositol	Expresión constitutiva por glicerol, glucosa y MeOH	Liang et al., (2013)
G1	Transportador de alta afinidad de la glucosa	Reprimido por glicerol, inducido en condiciones limitantes de glucosa	Prielhofer et al., (2013)
G6	Hipotética aldehído deshidrogenasa	Reprimido por glicerol, inducido en condiciones limitantes de glucosa	Prielhofer et al., (2013)

Adaptado de Ahmad et al., (2014).

### II.3.5. Vectores de expresión proteica para *P. pastoris*

Los vectores de expresión proteica diseñados para la producción de proteínas por *P. pastoris*, poseen las siguientes secuencias de ADN: un promotor de transcripción, uno o varios sitios de restricción donde clonar el gen de interés, una secuencia de terminación 3', propia de *P. pastoris*, que asegure la terminación correcta de transcripción del gen clonado, un marcador de selección para *P. pastoris* y *E. coli*, y una secuencia que permita la replicación del vector en *E. coli* ya que, previamente a su transformación en *P. pastoris*, el vector construido con el gen clonado se evalúa por su integridad y la presencia del gen de interés en células competentes de

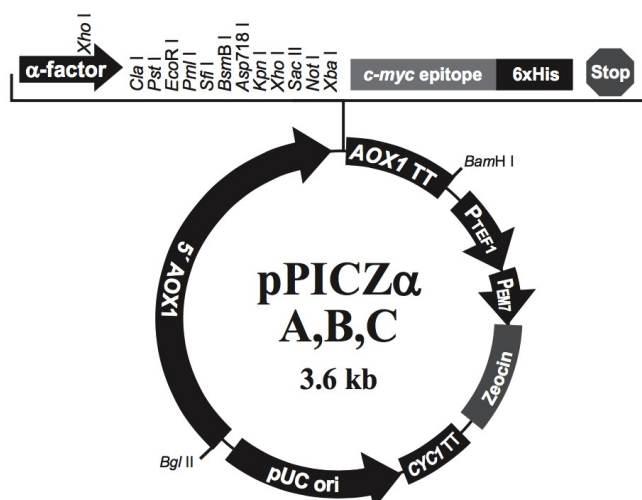
*E. coli* (Li et al., 2007). Algunos de los vectores utilizados para la expresión de proteínas por *P. pastoris* se muestran en la Tabla II.5. El vector pPICZ $\alpha$  se muestra en detalle en la Figura 2.11.

Los vectores de expresión proteica utilizados para la producción de proteínas por *P. pastoris* son, en su mayoría integrativos, es decir, se integran en el genoma de *P. pastoris* por recombinación con secuencias homólogas de su genoma, asegurando así su estabilidad. Por lo tanto, los vectores de expresión proteica también incluyen secuencias nucleotídicas, homólogas con las del genoma de *P. pastoris*, con el propósito de dirigir la integración del vector de expresión por recombinación en lugares específicos del genoma de *P. pastoris*. Estas secuencias homólogas suelen ser parte de la secuencia nucleotídica del gen de la alcohol oxidasa 1 (AOX1), del gen de la histidinol deshidrogenasa (HIS4) o una secuencia de ADN homóloga a la región 3' del gen que codifica la enzima AOX1.

**Table II.5. Vectores utilizados para la producción de proteínas por *P. pastoris***

Vector	Promotor	Antibiótico de selección	Gen marcador de selección	Tags y péptidos señal
pAO815	AOX1	Amp	HIS4	No
pGAPZ	GAP	Zeo		C-6xHis
pGAPZ $\alpha$	GAP	Zeo		$\alpha$ -factor C-6xHis
pHIL-S1	AOX1		HIS4	Péptido señal
pPIC3.5K	AOX1	Amp Kan	HIS4	No
pPIC9K	AOX1	Amp Kan	HIS4	No
pPICZ	AOX1	Zeo		C-6xHis
pPICZ $\alpha$	AOX1	Zeo		$\alpha$ -factor C-6xHis
pP- $\alpha$ hSUMO3	AOX1	Zeo		6xHis-hSUMO3

Adaptado de Ahmad et al., (2014).



**Figura 2.11. Vector de expresión proteica pPICZ $\alpha$ :** Easy Selection Pichia Expression kit. Adaptado de Invitrogen Co., Paisley, UK.

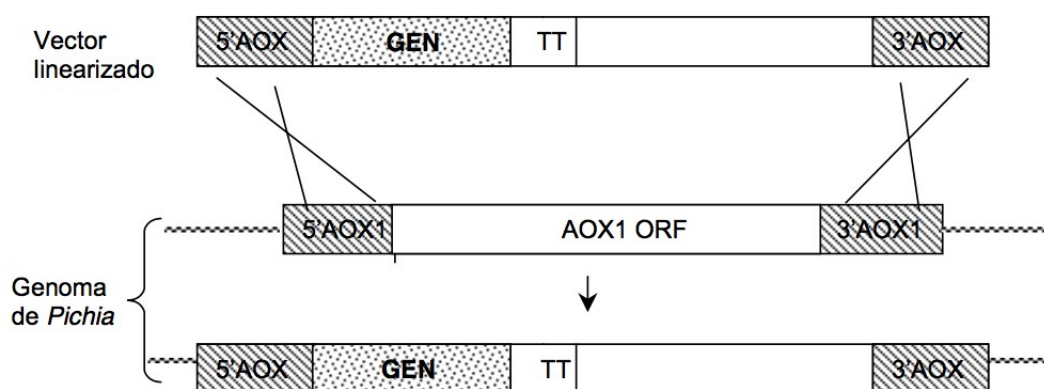
### ***Marcadores celulares***

Como se ha comentado previamente, la inserción del vector de expresión proteica en el genoma de *P. pastoris* puede dirigirse al gen que codifica la enzima HIS4 pudiendo realizar la selección de los clones transformados como His<sup>+</sup>, en cepas originalmente His<sup>-</sup>. Otros vectores incluyen un marcador celular de menores dimensiones que el de la enzima HIS4 (3Kb), como el gen *Sh ble* de *Streptoalloteichus hindustanus*. Este gen, de tan sólo 375 pb codifica una proteína que confiere resistencia al antibiótico zeocina y es muy eficaz en *E. coli*, levaduras y otras células eucariotas. La incorporación de este gen en los vectores de expresión proteica reduce sustancialmente su tamaño y, además, permite una selección directa de los clones transformados (Cregg et al., 1985, 1989; Higgins et al., 1998). Algunos vectores de expresión también incorporan el gen de resistencia a la ampicilina o kanamicina como marcadores exclusivos para *E. coli*. También existen otros genes de selección que permiten el desarrollo de levaduras auxótrofas a algún componente necesario para su desarrollo en un medio de cultivo, incorporados en los vectores de expresión como los genes que codifican la enzima PR-amidoimidazol succiocarboxamida sintasa, la arginosuccinato liasa o la orotidina fosfato descarboxilasa (Cereghino y Cregg, 2000).

#### **II.3.6. Estrategias de integración y fenotipo Mut (del inglés, *methanol utilisation*) de *P. pastoris***

La manera más sencilla de integración de los vectores de expresión proteica en el genoma de *P. pastoris* es por recombinación homóloga con la región del gen que codifica la enzima HIS4 o AOX1. El vector plasmídico de expresión se lineariza con una enzima de restricción y la forma linearizada del vector se integra en el genoma de *P. pastoris* por recombinación entre secuencias génicas idénticas del vector y del genoma, lo que permite incorporar el vector completo sin afectar la secuencia genómica. Alternativamente, algunos vectores pueden digerirse de manera que el fragmento linearizado quede flanqueado por las secuencias 5' y 3' del gen que codifica la enzima AOX1. Esto supone la incorporación del vector por sustitución y puede devenir en la delección o no del gen que codifica la enzima AOX1 en *P. pastoris* (Figura 2.12).

La delección del gen que codifica la enzima AOX1 implica desproveer a la célula del 90% de la enzima alcohol oxidasa, quedando solamente el gen funcional de la enzima AOX2. Este tipo de células metabolizan muy lentamente el metanol, debido a la baja concentración de alcohol oxidasa sintetizada y se denominan Mut<sup>s</sup> (del inglés, *methanol utilisation slow*). Por el contrario, las cepas Mut<sup>+</sup> (del inglés, *methanol utilisation plus*) son aquellas en las que la recombinación e inserción del vector linearizado de expresión no implica la interrupción del gen que codifica la enzima AOX1, y la síntesis de alcohol oxidasa no se ve muy afectada. Este hecho afecta de forma importante la expresión de la enzima AOX1, la metabolización del metanol por la célula y por ende, la expresión del gen clonado bajo el control de promotor PAOX1 (Cos et al., 2006).



**Figura 2.12. Recombinación doble entre los extremos homólogos del vector linealizado y el genoma de *P. pastoris*.** Esto supone la inserción del gen de interés mediante pérdida del gen que codifica la enzima AOX1, generando un fenotipo Mut<sup>S</sup>. Fuente: Serrano, (2001).

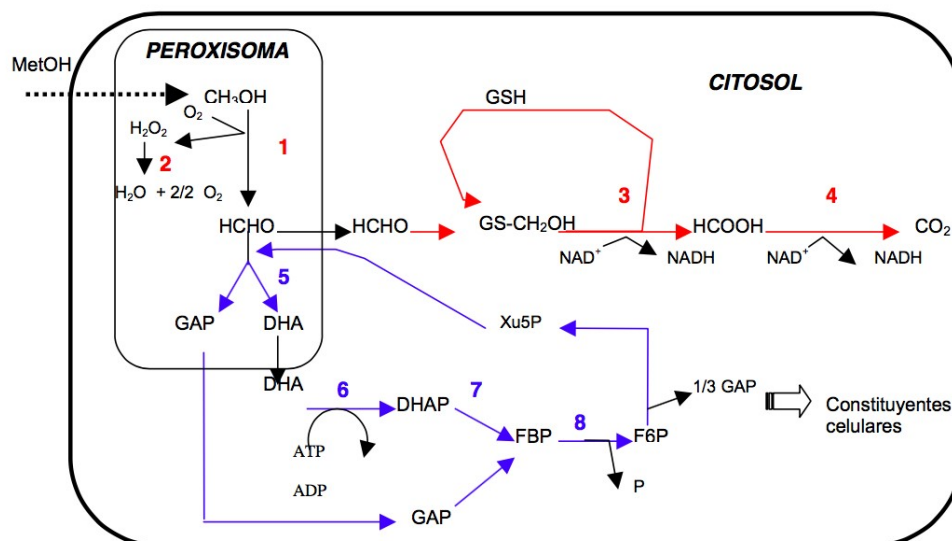
También puede darse la delección de los genes que codifican ambas enzimas (AOX1 y AOX2), generando un fenotipo Mut<sup>-</sup>. A veces, estas cepas son más productoras de proteínas recombinantes que las cepas salvajes con la ventaja de que apenas necesitan metanol para su desarrollo (Veenhuis et al., 1983).

Las cepas de *P. pastoris* utilizadas para la producción heteróloga de proteínas derivan de la cepa de *P. pastoris* NRRL-Y 11430 (Northern Regional Research Laboratories, Peoria, IL, USA) y la mayoría muestran un fenotipo HIS<sup>-</sup>. No obstante, las cepas de *P. pastoris* GS115 y KM71 con el fenotipo Mut<sup>+</sup> His<sup>-</sup> y la cepa de *P. pastoris* X-33 con el fenotipo Mut<sup>+</sup> His<sup>+</sup> son las más utilizadas. Sin embargo, existen otra gran variedad de cepas de *P. pastoris* útiles para la producción heteróloga de proteínas como las cepas auxótrofas para distintos compuestos, disponibles con vectores que expresan los genes necesarios para la síntesis de los compuestos que limitan su desarrollo (p. ej., *adel*, *arg4*, *his4*, *ura3*, *met2*), cepas deficientes en proteasas como la de *P. pastoris* SMD1163 ( $\Delta his4$ ,  $\Delta pep4$ ,  $\Delta prb1$ ), *P. pastoris* SMD1165 ( $\Delta his4$ ,  $\Delta prb1$ ) y *P. pastoris* SMD1168 ( $\Delta his4$ ,  $\Delta pep4$ ) para proteínas sensibles a proteasas o cepas de *P. pastoris* diseñadas para favorecer determinadas modificaciones postraduccionales (Ahmad et al., 2014).

### II.3.7. Metabolismo del metanol en *P. pastoris*

La enzima alcohol oxidasa (AOX1 y AOX2) cataliza la primera reacción de oxidación del metanol en los peroxisomas. La AOX1 posee una baja afinidad por sus substratos, el metanol y el oxígeno molecular, lo que se compensa aumentando su tasa de síntesis llegando a alcanzar hasta un 30% de la proteína soluble total de la célula (Cregg et al., 1989). Asimismo, el formadehído generado por la oxidación del metanol tiene dos destinos: (1) se oxida hasta CO<sub>2</sub> en el citosol; en este caso, las enzimas que catalizan estas reacciones son dependientes de NAD<sup>+</sup> y de su actividad se desprende poder reductor en forma de NADH, que es utilizado por la levadura para su actividad celular. Por otro lado (2), el formaldehído generado forma triosas, que se condensan en hexosas y que permiten a la célula generar material celular.





**Figura 2.13. Metabolismo del metanol en levaduras metilotróficas.** En rojo, el metabolismo energético. En azul, vía de asimilación del carbono. Los números indican las enzimas involucradas en cada reacción: 1, alcohol oxidasa (AOX); 2, catalasa; 3, formaldehído deshidrogenasa (FLD); 4, formiato deshidrogenasa (FMD); 5, dihidroxiacetona sintasa (DAS); 6, dihidroxiacetona quinasa; 7, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa; 8, fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa. Metabolitos:  $\text{CH}_3\text{OH}$ , metanol;  $\text{HCHO}$ , formaldehído;  $\text{GS-CH}_2\text{OH}$ , S-Formilglutionato;  $\text{HCOOH}$ , formiato;  $\text{CO}_2$ , dióxido de carbono;  $\text{GAP}$ , gliceraldehído monofosfato;  $\text{DHA}$ , dihidroxiacetona;  $\text{DHAP}$ , dihidroxiacetona fosfato;  $\text{FBP}$ , fructosa 1,6-bisfosfato;  $\text{F6P}$ , fructosa 6-fosfato;  $\text{Xu5P}$ , xilulosa monofosfato. Fuente: Serrano, (2001).

### II.3.8. Secreción de proteínas

La expresión de proteínas por levaduras puede ser intracelular o extracelular. La expresión intracelular requiere de la secuencia Kozak, que facilita el reconocimiento de la secuencia de iniciación (AUG) durante el proceso de traducción en eucariotas por lo que, el gen de interés, se inserta en línea y a continuación de esta secuencia utilizando los lugares de restricción para las enzimas *EcoRI* y/o *NotI*. Sin embargo, para la expresión de proteínas extracelulares la señal de secreción más utilizada es la que codifica la región prepro del factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae* ( $\alpha$ -MF) por lo que, el gen de interés, se inserta en línea y a continuación de esta señal, utilizando los lugares de restricción para las enzimas *XhoI* y/o *NotI*. La región pre del factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae* ( $\alpha$ -MF) dirige la proteína sintetizada hacia el retículo endoplásmico donde es procesada por peptidasas mientras la región pro transfiere la proteína del retículo endoplásmico al aparato de Golgi donde es, finalmente, procesada a nivel de los aminoácidos KR por la endoproteasa Kex2p (Julius et al., 1984; Waters et al., 1988). Como señales de secreción extracelular para *P. pastoris* también se utilizan los péptidos señal de una invertasa de *S. cerevisiae* (SUC2) o la fosfatasa ácida endógena de *P. pastoris* (PHO1) (Daly y Hearn, 2005). El diseño del vector de expresión asegura que el producto resultante de la transcripción sea un ARNm maduro, reconocible por los sistemas de traducción, procesamiento y secreción de la levadura *P. pastoris* (Romanos et al., 1992).

Las proteínas producidas por *P. pastoris* pueden fusionarse a colas peptídicas, péptidos cortos o proteínas de fusión. Para ello, el gen que codifica una proteína, péptido o región proteica de interés se fusiona a una secuencia, cola o *tag* (etiqueta) que codifica péptidos o proteínas que incrementan la expresión, solubilidad y funcionalidad de las proteínas recombinantes (Terpe, 2003). Además, las colas fusionadas pueden reducir la degradación proteolítica, favorecer el plegamiento correcto de la proteína producida, aumentar su solubilidad y simplificar su purificación y detección. Las colas fusionadas suelen ser péptidos cortos que no interfieren con la proteína de interés como poly-Arg-, FLAG-, poly-His-, c-myc-, S-, and Strep II-tag o péptidos más extensos como la proteína de unión a maltosa (MBP, del inglés *Maltose- Binding Protein*), glutathion S-transferasa (GST), tiorredoxina (TRX), la proteína de transcripción NusA, ubiquitina (UB) o la proteína SUMO (del inglés, *small ubiquitin-like modifier*) (Waugh, 2005; Butt et al., 2005; Panavas et al., 2009). No obstante, todas las colas peptídicas pueden afectar la funcionalidad de la proteína sintetizadas por lo que suelen eliminarse de la proteína fusionada por la actividad de proteasas con sitios específicos de corte y fácil inactivación (Terpe, 2003).

### **II.3.9. Factores que afectan a la producción heteróloga de proteínas y péptidos por *P. pastoris***

Se conocen numerosos factores que pueden afectar la producción de proteínas heterólogas por *P. pastoris*. Algunos de ellos son intrínsecos al sistema de expresión como, por ejemplo, el fenotipo Mut de la cepa, el lugar de inserción del gen de interés en el genoma celular, el número de copias del gen clonado, el tipo de expresión intra- o extracelular, la naturaleza de la señal de secreción (en caso de expresión extracelular), la actividad de proteasas endógenas, el contenido de GC o el uso de codones de uso preferenciales. Otros factores están más relacionados con la proteína a expresar como, por ejemplo, el contenido GC/AT del gen a expresar o la toxicidad de la proteína heteróloga para la célula hospedadora. Otros factores importantes son la estabilidad del mRNA o el tipo y clase de las posibles modificaciones post-transcripcionales y/o traduccionales (Jenkins et al., 1996; Wright y Morrison, 1997). En este contexto, las modificaciones post-traduccionales generadas por *P. pastoris* se asemejan más a las de organismos eucariotas superiores que las realizadas por *S. cerevisiae* ya que, a diferencia de este último, *P. pastoris* no hiperglicosila las proteínas sintetizadas y la longitud máxima de las cadenas de oligosacáridos introducidas no supera los 30 residuos de manosa, en comparación con los 50-150 residuos generados por *S. cerevisiae* (Cereghino y Cregg, 2000). Además, *P. pastoris* no contiene la enzima responsable de la formación de residuos tipo  $\alpha$  1,3-manosa, principal causante de la naturaleza antigénica de las glicoproteínas producidas por *S. cerevisiae* y que dificultan su utilidad con fines terapéuticos (Cregg et al., 1993). Por otra parte, *P. pastoris* prácticamente no secreta proteínas nativas ni proteinasas al medio extracelular, lo que simplifica la recuperación y purificación de la actividad biológica de las proteínas y péptidos recombinantes producidos (Macauley-Patrick et al., 2005; Ahmad et al., 2014).

### **II.3.10. Péptidos antimicrobianos producidos por levaduras**

Por lo que respecta a la producción heteróloga de bacteriocinas por levaduras, los investigadores Schoeman et al., (1999) fueron los primeros en describir la expresión de PedA-1 por *S.*

*cerevisiae*. Para ello, dichos investigadores utilizaron un vector de expresión proteica con el péptido señal (PS) del factor alfa (MF $\alpha$ 1s, del inglés *Mating Pheromone  $\alpha$ -factor 1 secretion signal*), una feromona que se sintetiza como una preproteína, bajo el control del promotor del gen de la alcohol deshidrogenasa fusionado a la PedA-1 madura. La transformación de *S. cerevisiae* con el plásmido recombinante se tradujo en la producción de PedA-1 biológicamente activa, pero con diferencias en la actividad antimicrobiana de la PedA-1 dependiendo del desarrollo de la levadura productora en medio sólido o líquido, con una actividad antimicrobiana prácticamente indetectable en medio líquido. Esto se atribuyó a que la bacteriocina sintetizada se mantenía asociada a la membrana y/o la pared celular de las levaduras productoras. Sin embargo, la ausencia de técnicas analíticas fiables de detección y cuantificación de la PedA-1 producida no permitió determinar la relación entre la bacteriocina producida y su actividad biológica, probablemente disminuida por una posible glicosilación de su molécula, por la actividad de enzimas proteolíticos, por agregación entre sí o a otras moléculas o por causas bioquímicas o biofísicas todavía desconocidas.

Posteriormente, Van Reenen et al., (2003) describieron la clonación y producción de la Pln423 de *Lb. plantarum* 423 por *S. cerevisiae*, con las mismas limitaciones respecto a la actividad antimicrobiana de la Pln423 en los sobrenadantes de las cepas recombinantes que las encontradas respecto a la producción y actividad antimicrobiana de la PedA-1 producida por *S. cerevisiae* (Schoeman et al., 1999). El gen estructural de la PedA-1 también se ha expresado en la levadura *P. pastoris* KM71H (Mut<sup>S</sup>) utilizando el vector de expresión pPICZ $\alpha$ A (Beaulieu et al., 2005). Aunque el uso de anticuerpos policlonales anti-PedA-1 permitieron la detección y cuantificación inmunoquímica de la PedA-1 en los sobrenadantes de los cultivos de *P. pastoris* recombinantes, la PedA-1 producida no mostró actividad antimicrobiana debido a una gran asociación a la PedA-1 recombinante, probablemente mediante enlaces covalentes, de un material similar al colágeno.

Sin embargo, estudios posteriores han demostrado la producción y expresión funcional de diversas bacteriocinas por levaduras. La clonación del gen de la EntP madura (*entP*) en el vector de expresión pPICZ $\alpha$ A y su posterior transferencia a células competentes de *P. pastoris* X-33, permitieron una elevada producción de la EntP biológicamente activa en los sobrenadantes de las levaduras recombinantes. La producción de EntP por la cepa de *P. pastoris* X-33, desarrollada en un medio de cultivo complejo, fue 3,7 veces mayor que la producción de dicha bacteriocina por *E. faecium* P13, mientras su actividad antimicrobiana y actividad antimicrobiana específica fueron 16 y 4,3 veces mayores, respectivamente, que la de la EntP producida por *E. faecium* P13 (Gutiérrez et al., 2005). La clonación de la bacteriocina HirJM79, producida por *E. hirae* DCH5, en el vector de expresión pPICZ $\alpha$ A transferido a *P. pastoris* X-33TH también ha facilitado la producción y expresión funcional de la HirJM79 por dicho hospedador. Sin embargo, aunque la producción de HirJM79 por *P. pastoris* X-33TH fue superior a la producción de la misma bacteriocina por *E. hirae* DCH5, su actividad antimicrobiana y actividad antimicrobiana específica fueron menores de la deducida de su producción (Sánchez et al., 2008).

La clonación de la EntL50 (EntL50A y EntL50B) en vectores de expresión proteica apropiados también ha permitido la producción y expresión funcional de la EntL50A, EntL50B y de ambas por células recombinantes de *S. cerevisiae* (Basanta et al., 2009, 2010). Para ello, primero se hizo necesario construir un vector de expresión y secreción estable para *S. cerevisiae*, denominado pYABD01, por medio de la clonación del PS del factor MF $\alpha$ 1s en el vector de expresión de *S. cerevisiae*, denominado pYES2. Posteriormente, los genes estructurales de la EntL50A y EntL50B (entL50A y entL50B) se clonaron juntos o separados en dicho vector bajo el control del promotor del operon Gal1 (Pgal1), inducible por galactosa y represible por glucosa, y los vectores derivados resultantes se transfirieron a células competentes de *S. cerevisiae*. Los genes estructurales de la EntL50A y EntL50B se clonaron también en el vector pPICZ $\alpha$ A para su expresión por *P. pastoris*. De esta manera, se obtuvieron levaduras recombinantes de *S. cerevisiae* y *P. pastoris*, productoras de las bacteriocinas EntL50A y EntL50B con actividad biológica. No obstante, convendría optimizar la producción de ambas bacteriocinas por *S. cerevisiae* y *P. pastoris* ya que su producción y actividad antimicrobiana fueron inferiores a las observadas con otras bacteriocinas previamente evaluadas (Basanta et al., 2010).

La bacteriocina EntA también se ha producido satisfactoriamente por las levaduras *P. pastoris* X-33EA, *K. lactis* GG799EA, *H. polymorpha* KL18-1EA y *A. adenivorans* G1212EA transformadas, respectivamente, con los vectores de expresión proteica pPICEA, pKLEA, pBTEA y pBYEA (Borrero et al., 2012). De gran interés, es el notable incremento (20-30 veces) de la producción de EntA por *P. pastoris* X-33EA y, sobre todo, la elevada actividad antimicrobiana (255-430 veces) y elevada actividad antimicrobiana específica (11-14 veces) de la EntA producida por *P. pastoris* X-33EA, respecto a la producida por el productor natural *E. faecium* T136. Más aún, una vez purificada a homogeneidad, la EntA exhibe una actividad antimicrobiana y una actividad antimicrobiana específica frente a *Listeria* spp. mucho mayor que la deducida de su concentración y de su comparación con la EntA purificada producida por *E. faecium* T136 (Borrero et al., 2012). Recientemente, el diseño y uso de genes sintéticos para la expresión de bacteriocinas ha permitido la clonación, producción y expresión funcional de la EntA por *P. pastoris* y *K. lactis* (Jiménez et al., 2014).

La levadura *P. pastoris* también ha permitido la producción heteróloga de numerosos PAMs/PDHs producidos por eucariotas (Tabla II.6). Por ejemplo, las penaeidinas 2 y 3 producidas por la gamba *Penaeus vannamei* se expresaron por *S. cerevisiae* con una actividad antifúngica y bactericida frente a bacterias Gram-positivas, similar a la de los péptidos naturales (Destoumieux et al., 1999). Asimismo, cuando ambos PAMs se expresaron por *P. pastoris* se obtuvieron unos de niveles de producción mayores. Igualmente, la producción de escignodina producida por una especie de cangrejo y expresada por *P. pastoris* (Peng et al., 2012), permitió una producción del péptido 1,3 veces mayor que cuando se clonó en *E. coli* (Peng et al., 2010). Otro ejemplo de mejora en la producción de PAMs/PDHs por *P. pastoris* respecto a *E. coli* es la expresión de la defensina vegetal SPE10; su producción no permitió detectar concentraciones medibles del péptido clonado en *E. coli* (Song et al., 2005) y, sin embargo, se cuantificaron 7 mg/L del péptido SPE10 cuando se expresó por *P. pastoris*. No obstante, conviene conocer que, en muchos casos, la producción heteróloga de PAMs/PDHs por levaduras no ha funcionado

bien, como la expresión de pleurocidina (Burrowes et al., 2005), catelicidina CAP18LL-37 (Hong et al., 2007; Kim et al., 2009) o la defensina Pdc1 (Kant et al., 2009) por *P. pastoris*.

Cabe destacar que el promotor de la alcohol oxidasa (PAOX1) es el más empleado para dirigir la producción de proteínas heterólogas por levaduras, pero también es posible el empleo de vectores de expresión proteica con otros promotores, inducibles o constitutivos. Por ejemplo, el promotor constitutivo de la enzima gliceraldehido-3-fosfato (GAP) se ha empleado con éxito para producir la catelicidina humana CAP18LL-37 (Hong et al., 2007) o la defensina de maíz PdC1 (Kant et al., 2009) por *P. pastoris*.

No obstante, la variabilidad de resultados procedente de estudios relativos a la producción de péptidos y proteínas heterólogas por levaduras, pone de manifiesto la dificultad existente en la predicción de la eficacia de los mismos, lo que hace necesario continuar realizando un esfuerzo investigador mayor para la producción de mayores cantidades de bacteriocinas y otros PAMs/PDHs, que permitan un mejor aprovechamiento del potencial bioconservante y terapéutico de los mismos por la industria alimentaria y en medicina humana y veterinaria y en producción animal.

Tabla II.6. Producción heteróloga de PAMs/PDHs producidos por eucariotas, por levaduras<sup>a</sup>

PAMs/PDHs	Origen	Productor heterólogo	Expresión	Detección	Cantidad	Referencia
ABP-CM4	<i>Bombyx mori</i>	<i>P. pastoris</i>	Inducida	Zona de inhibición	ND <sup>b</sup>	(Zhang et al., 2006)
Proteína antifúngica AFP	<i>Aspergillus giganteus</i>	<i>P. pastoris</i>	Inducida	Actividad antifúngica <i>in vitro</i>	2.5 mg/L	(López-García et al., 2010)
Catelidina CAP18LL-37	Humano	<i>P. pastoris</i>	Constitutiva	Test de difusión en agar	ND	(Hong et al., 2007b)
Catelidina CAP18LL-37	Humano	<i>P. pastoris</i>	Inducida	Test de difusión en agar	ND	(Kim et al., 2009)
Cecropina A (Mdccc)	<i>Musca domestica</i>	<i>P. pastoris</i>	Inducida	CMI <sup>c</sup>	20 mg/L	(Jin et al., 2006)
Ch-Penacina (rCHP)	<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	<i>P. pastoris</i>	Inducida	CMI	180 mg/L	(Destoumieux et al., 1999)
Defensina (Pdcl)	Línea de maíz CO387	<i>P. pastoris</i>	Constitutiva	Ensayo en placa de microtitulación y microscopía de fluorescencia	ND	(Kant et al., 2009)
Defensina (Psd1)	<i>Pisum sativum</i>	<i>P. pastoris</i>	Inducida	IC50	63 mg/L	(Cabral et al., 2003)
Defensina (VrD1)	Soja verde	<i>P. pastoris</i>	Inducida	IC50	ND	(Chen et al., 2004)
Defensina SPE10	Semillas de <i>Pachyrhizus erosus</i>	<i>P. pastoris</i>	Inducida	IC50	7.0 mg/L	(Song et al., 2005)
Lactoferrapina fusionada a lactoferricina	Bovino	<i>P. pastoris</i>	Inducida	Zona de inhibición/CMI	ND	(Tang et al., 2012)
Plectasina	<i>Pseudoplectania nigrella</i>	<i>P. pastoris</i>	Inducida	Zona de inhibición	748.63 mg/L	(Zhang et al., 2011)
Pleurodicina	<i>Pleuronectes americanus</i>	<i>P. pastoris</i>	Inducida	ND	10 mg/L	(Burrowes et al., 2005)
Interferón porcino-(pIFN-)	Porcino	<i>P. pastoris</i>	Constitutiva	ND	ND	(Yu et al., 2010)
Scygonadina	<i>Cherax quadricarinatus</i>	<i>P. pastoris</i>	Inducida	CMI	89.2 mg/L	(Peng et al., 2012)
a-Defensina (HD5)	Humano	<i>P. pastoris</i>	Inducida	CMI	165 mg/L	(Wang et al., 2009)
a-Sarcin	<i>Aspergillus giganteus</i>	<i>P. pastoris</i>	Inducida	Producción en lisado celular	ND	(Martínez-Ruiz et al., 1998)
Defensin (msBD-1)	Ovino	<i>P. pastoris</i>	Inducida	Zona de inhibición	35 mg/L	(Zhao y Cao, 2012)
Defensin 2 (hPAB-)	Humano	<i>P. pastoris</i>	Inducida	Test de difusión en agar	241 mg/L	(Chen et al., 2011)
Defensin-1	Humano	<i>S. cerevisiae</i>	Constitutiva	Test de difusión en agar	55 mg/L	(Cipáková et al., 2005)
Ch-Penacina (rCHP)	<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	<i>P. pastoris</i>	Inducida	CMI	180 mg/L	(Li et al., 2005)

<sup>b</sup>ND: not determined; <sup>c</sup>CMI, concentración mínima inhibitoria. <sup>a</sup>Adaptado de Parachin et al., (2012).

## II. 4. EL BUITRE LEONADO (*Gyps fulvus* subespecie *fulvus*)

### II.4.1. Biología del buitre leonado

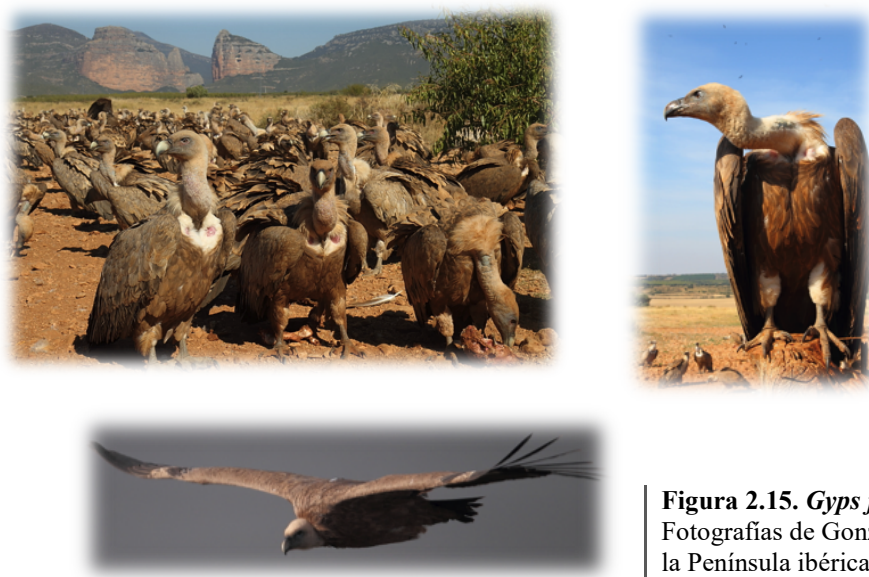
El buitre leonado (*Gyps fulvus* subespecie *fulvus*) es una especie de ave accipitriforme de la familia *Accipitridae* de la que se han descrito dos subespecies: *Gyps fulvus fulvus*, localizado en el noroeste de África y la península Ibérica hasta Oriente Medio y *Gyps fulvus fulvescens*, localizado en Afganistán, Pakistán y norte de la India. Los buitres leonados pertenecen al grupo de los buitres del viejo mundo no relacionados con los buitres y cóndores del nuevo mundo (familia *Cathartidae*), con los que solo comparten nicho ecológico como carroñeros.



**Figura 2.14. Distribución de *Gyps fulvus*.**  
Imagen de Sting/The Engineer

El buitre leonado es una rapaz inconfundible con capacidad para la detección y consumo de carroñas de gran tamaño. Con más de 2,5 metros de envergadura y un peso de 6-9 kilos, este carroñero es una de las aves más voluminosas de Europa y también una de las más longevas. Apenas existe dimorfismo sexual en cuanto a su tamaño. Las aves adultas tienen una coloración canela en el plumaje del dorso, el vientre y la franja anterior de las alas, mientras que el resto de las plumas alares y de la cola son pardas oscuras. La cabeza y cuello, desplumado y largo, están cubiertos de un plumón blanco. Poseen un característico collar de largas plumas leonadas. El pico es pardo en el centro y su base y punta son amarillas. Los pies son de color gris plomo. Los juveniles, por su parte, son de color marrón rojizo, más oscuro que en los adultos, y poseen un plumaje compuesto por plumas lanceoladas con finas estrías claras, que son renovadas progresivamente por otras de perfil redondeado.

En vuelo sus alas parecen tablas. Las bate con las primarias abiertas y desplegadas, el cuello recogido y la cola corta. El buitre es un planeador nato, que apenas bate sus alas, ganando altura rápidamente con sólo imperceptibles movimientos de la cola. Desde el suelo arranca dándose un impulso. Es un ave silenciosa salvo en las disputas por las carroñas o por los mejores emplazamientos en posaderos y dormideros, cuando emite una larga serie de sonidos guturales y bufidos.



**Figura 2.15. *Gyps fulvus* subespecie *fulvus*.**  
Fotografías de Gonzalo Saavedra tomadas en la Península ibérica.

### ***Hábitat***

Se trata de una especie de distribución amplia que ocupa el suroeste y sureste de Europa, el noroeste y sur de África, los Balcanes, Turquía, Arabia, Irán, Afganistán, Pakistán y norte de la India. En España, esta rapaz se distribuye por la mayoría de las cadenas montañosas, excepto el sector más occidental de la cordillera cantábrica y la mayoría de las sierras litorales del Mediterráneo, así como por llanuras con cortados fluviales de cierta entidad. El grueso de la población se concentra en Aragón y Castilla y León fundamentalmente, así como en Andalucía, Navarra, Castilla-La Mancha y Extremadura. A pesar de esta distribución, el buitre leonado puede realizar enormes desplazamientos en busca de alimento o constituyendo agrupaciones temporales en enclaves con abundancia de recursos.

### ***Población***

En el censo de buitre leonado del año 2008 se localizaron 24.609-25.541 parejas, lo que lleva a un cómputo total de 76.288-79.177 ejemplares, que incluye adultos no reproductores e inmaduros. La población española supone más del 80% de los buitres leonados europeos, encontrándose las colonias más importantes en Castilla y León y Aragón (SEO/BirdLife, 2008).

### ***Reproducción***

Para la crianza el buitre leonado se instala en cortados rocosos, ya sea en zonas de montaña, donde alcanza los 2.000 metros de altitud o en cañones fluviales, siempre relativamente cerca de áreas abiertas con escaso arbolado. Es una especie colonial, que suele agruparse para criar, a veces en grupos de cientos de parejas. Todavía en invierno, los buitres leonados realizan vuelos de cortejo para reafirmar los lazos de pareja, que son muy intensos y se mantienen de por vida. La puesta suele acontecer muy tempranamente, entre mediados de enero y mediados de febrero y consta de un solo huevo. La incubación se prolonga durante 48-54 días y, de ella,



se ocupan ambos sexos de forma equitativa. El pollo permanece en el nido 110-115 días, hasta que a finales del verano o comienzos del otoño puede valerse por sí mismo.

### ***Alimentación***

Se trata de una especie netamente carroñera y especializada en el consumo de grandes mamíferos, tanto silvestres como domésticos. Normalmente, tras la detección de un cadáver por algún ejemplar, en cuestión de minutos van llegando nuevos individuos que han detectado el movimiento de los primeros hacia ese punto, llegando a congregarse decenas de individuos. Los cuerpos serán consumidos en cuestión de horas. Otros necrófagos estrictos como el buitre negro y el alimoche también se alimentan de estos restos.

Tradicionalmente la dieta de los buitres consistía en cadáveres de ganado vacuno, ovino, caprino y porcino, dependiendo de la cabaña dominante en cada área. En zonas con escasa o nula actividad se alimentan de ungulados silvestres como el ciervo, el gamo o el jabalí, especialmente en los cotos de caza mayor. Sin embargo, con la mecanización del trabajo en el campo y la producción animal intensiva que estabula el ganado, se redujo el acceso natural a esta fuente de alimento y comenzaron a establecerse puntos de alimentación suplementaria o muladares, en los que se depositan de forma regular restos de ganado para compensar la falta de alimento en el campo. Los buitres también comenzaron a frecuentar vertederos en busca de alimento. En el año 2002, a raíz de la aparición de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) se impuso una férrea normativa sanitaria (Real Decreto 1098/2002) de cara a evitar la posible transmisión de la enfermedad, lo que supuso el cierre de numerosos comederos y la prohibición de abandonar restos de animales en el campo. Como consecuencia, se comenzó a observar una tendencia negativa en el crecimiento poblacional de estas especies, en especial del buitre leonado, e incluso se dieron ataques a ganado vivo. El Real Decreto 664/2007 suavizó la normativa anterior y autorizó el empleo de restos que antes quedaban prohibidos, como las reses mayores de dos años y las ovejas de más de 18 meses de edad, siempre y cuando los resultados de posibles EETs fuesen negativos. Actualmente, se encuentra vigente el Real Decreto 139/2011 que pretende asegurar la conservación de estas aves mediante zonas de protección para la alimentación fuera de comederos y en enclaves naturales de estas especies necrófagas.

#### **II.4.2. ¿Por qué los buitres?**

Los buitres participan en las primeras etapas de descomposición de la biomasa celular y juegan un importante papel ecológico al disminuir la presencia de microorganismos y parásitos, que pudieran manifestar un peligro para otros animales. Sin embargo, a pesar del contacto constante de los buitres con numerosos microorganismos patógenos o sus toxinas, estos animales no manifiestan signos aparentes de enfermedad. Se sabe que los buitres poseen uno de los sistemas inmunes más potentes de entre los vertebrados y un pH extremadamente ácido en su estómago, lo que contribuye a su fortaleza y resistencia frente a los agentes patógenos (Houston y Cooper, 1975). Además de estos factores, la microbiota gastrointestinal del buitre puede estar desempeñando una función fundamental en la defensa del hospedador frente al desarrollo de

microorganismos patógenos (Ruiz-Rodríguez et al., 2014). Los buitres se convierten, de esta manera, en reservorios de BAL potencialmente productoras de bacteriocinas con elevada actividad antimicrobiana y espectro de acción, frente a numerosos microorganismos patógenos para las personas y animales.

## II.5. SECUENCIACIÓN MASIVA DE ACIDOS NUCLEICOS

El desarrollo y empleo de técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos de nueva generación o NGS (del inglés, *Next-Generation Sequencing*) ha provocado una auténtica revolución en la investigación aplicada a ámbitos muy diversos de la biología (Voelkerding et al., 2009; Metzker, 2010; Hodkinson y Grice, 2015). A diferencia de la secuenciación Sanger, las plataformas NGS permiten la secuenciación de miles o millones de fragmentos de ADN en un único experimento. Además, el esquema principal de trabajo es conceptualmente similar para todas ellas (Metzker, 2010). Para ello, el ADN genómico se fragmenta primero y mediante ligación se le añaden secuencias adaptadoras a los extremos, generándose así una librería génica sin necesidad de clonar los fragmentos producidos. La amplificación de la librería se produce mediante el anclaje del fragmento de ADN, a través de sus adaptadores, a una superficie sólida bien una esfera o directamente una placa de secuenciación. La secuenciación se realiza alternando ciclos de terminación reversible cíclica y se utilizan terminadores reversibles para incorporar nucleótidos marcados con fluorescencia que a, continuación, son procesados por los equipos instrumentales. La secuenciación y detección de las bases ocurre al mismo tiempo en todas las moléculas de ADN (secuenciación masiva y paralela). Las secuencias cortas (150-400 pb) que constituyen los extremos del ADN con los adaptadores, originan lecturas o *reads*. En general, los nuevos secuenciadores generan lecturas a partir de cada uno de los extremos de un fragmento de ADN dando lugar a lecturas apareadas y lo hacen usando dos estrategias diferentes: (i) la secuenciación de tipo *single-end*, si solamente se lee uno de los extremos de los fragmentos de ADN o de tipo *paired-end* si se leen ambos extremos del mismo fragmento, lo que facilita el posicionamiento de lecturas que pueden localizarse en múltiples lugares del genoma lo que posibilita la identificación de variantes estructurales (Fullwood et al., 2009; Medvedev et al., 2009).

Un aspecto importante de las NGS es el número de veces que cada base del genoma se encuentra en las lecturas o *reads* de secuenciación. Este valor se denomina profundidad de cobertura o *coverage* y determina la fiabilidad del nucleótido asignado a esa posición en el genoma.

Actualmente las tecnologías y plataformas NGS mayoritariamente utilizadas (Hodkinson y Grice, 2015), son las de 454 (Roche) GS FLX (Dressman et al., 2003; Margulies et al., 2005), Illumina (Solexa) Genome Analyzer/HiSeq (Fedurco et al., 2006; Bentley et al., 2008) y Applied Biosystems SOLiD (Shendure et al., 2005) (Tabla II.7). Cada plataforma de secuenciación masiva se basa en principios químicos que generan diferencias en los resultados generados por ellas, tanto cualitativa como cuantitativamente (Rusk y Kiermer, 2008). Por ejemplo, para el análisis interacciones de proteínas con DNA (ChIP-seq, del inglés *chromatin*

*immunoprecipitation with massively parallel DNA sequencing*) las plataformas Illumina y SOLiD resultan más apropiadas que las de Roche 454, por su alto rendimiento. Sin embargo, las lecturas generadas con las plataformas Illumina y SOLiD resultan cortas para la secuenciación *de novo* de genomas completos, donde el 454 gana terreno (Green et al., 2006).

**Tabla II.7. Técnicas y plataformas de secuenciación de ácidos nucleicos de nueva generación (NGS)**

Tipo de plataforma	Amplificación clonal	Química	Longitud media máxima de lectura de cada plataforma
454	PCR de emulsión	Pirosecuenciación (secuenciación por síntesis)	700 bp (secuenciación <i>paired-end</i> disponible)
Illumina	PCR de puente	Nucleótidos marcados con terminadores reversibles (secuenciación por síntesis)	300 pb (secuenciación <i>paired-end</i> solapado disponible)
SOLiD	PCR de emulsión	Ligación con oligonucleótidos de 8-mer (secuenciación por ligación)	75 pb (secuenciación <i>paired-end</i> disponible)
Ion Torrent	PCR de emulsión	Detección de protones (secuenciación por síntesis)	400 bp (secuenciación bidireccional disponible)
PacBio	Sin amplificación por PCR (molécula monocatenaria de ADN única)	Nucleótidos marcados con sonda fluorescente (secuenciación <i>next-next</i> )	27.000 bp

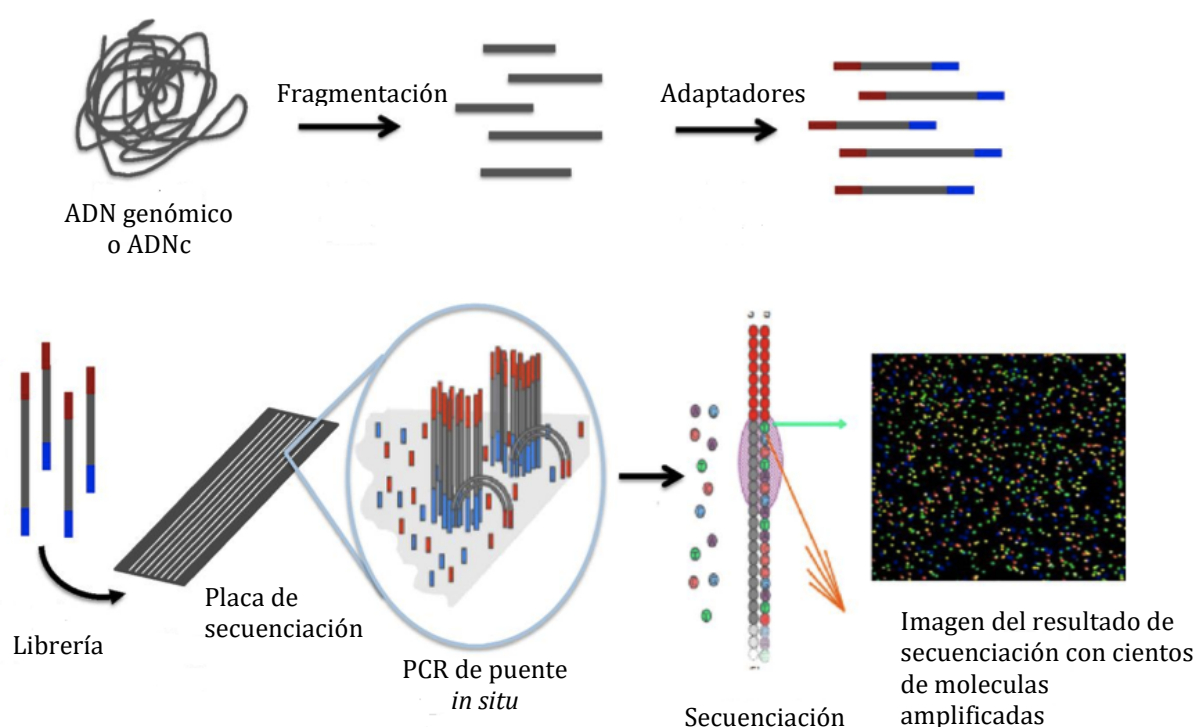
Adaptado de Hoodkinson y Grice, (2015).

Igualmente, la dificultad para reunir un mínimo número de muestras y poner en marcha un experimento o *run* completo, unido al elevado coste de adquisición de estos equipos, impulsó el desarrollo de secuenciadores más económicos, capaces de generar una menor cantidad de datos con la misma precisión que las plataformas de secuenciación masiva más grandes y, en menor tiempo. Así, durante los últimos años estos instrumentos han sufrido tantas mejoras y de forma tan rápida que ninguno de los actuales se parece al que fue lanzado inicialmente, con excepción de la química de secuenciación básica subyacente. Algunos ejemplos son los equipos 454 GS Junior de Roche, MiSeq Personal Sequencer de Illumina o Ion Torrent de Life Technologies. Desde su lanzamiento, estas plataformas más pequeñas se han extendido rápidamente en la comunidad científica dotando a pequeños laboratorios de la tecnología de secuenciación más avanzada (Loman et al., 2012). Esta mejora en los equipos de secuenciación ha permitido que Illumina genere lecturas o *reads* de hasta 300 pb, y aunque la tecnología 454 sigue generando lecturas más largas, las plataformas Illumina son muy válidas actualmente para secuenciaciões genómicas *de novo* y para análisis metagenómicos de calidad. Para la secuenciación *de novo* de genomas de eucariotas destaca la plataforma PacBio RS II de (Pacific Biosciences Inc. - Roche Diagnostics) capaz de generar lecturas o *reads* de más de 20 kb (Utturkar et al., 2014).

En paralelo al desarrollo de esta nueva generación de plataformas ha surgido un nuevo tipo de secuenciadores, todavía en sus fases iniciales de comercialización, que algunos denominan ya como la tercera generación (Rusk, 2009; Schadt et al., 2010) y que permite la secuenciación de moléculas de DNA (*single-molecule sequencing*) sin la necesidad de la amplificación de fragmentos de DNA mediante reacciones de PCR (Pushkarev et al., 2009).

### II.5.1. Plataformas Illumina (Solexa) GA/HiSeq/MiSeq/NextSeq

Las plataformas Illumina son las más empleadas actualmente para la secuenciación de ácidos nucleicos debido a su buena relación coste-beneficio (Lange et al., 2014; Fadrosh et al., 2014). La plataforma Illumina se basa en la incorporación de nucleótidos marcados con terminadores reversibles de manera que, en cada ciclo de ligación, solamente uno de los cuatro nucleótidos posibles se une de forma complementaria al ADN molde, emitiendo una señal luminosa que es captada por un sistema óptico altamente sensible. Posteriormente, el terminador es eliminado para permitir la incorporación del siguiente nucleótido en ciclos sucesivos de secuenciación (Figura 2.14). Un vídeo explicativo de cómo funciona esta plataforma puede observarse en <https://www.youtube.com/watch?v=womKfikWlxM>.



**Figura 2.16. Funcionamiento de plataforma NGS Illumina.** Adaptado de Johnsen et al., (2013).

La plataforma MiSeq es la que permite generar lecturas más extensas, con lecturas *paired-end reads* de 300 pb mientras la plataforma HiSeq 2500 es la de mayor rendimiento, con 4 billones de fragmentos *paired-end* de 125 pb cada uno. El equipo HiSeq X Ten combina 10 máquinas HiSeq en una sola unidad de trabajo, permitiendo un rendimiento de secuenciación muy elevado. Otro equipo, lanzado recientemente, es el NextSeq 500 dado a conocer como el primer secuenciador de escritorio.

### II.5.2. Análisis bioinformático

La ingente cantidad de información derivada de la utilización de plataformas de secuenciación masiva, ha forzado el desarrollo de herramientas bioinformáticas que permitan almacenar,

analizar e interpretar un gran volumen de datos (Richter y Sexton, 2009; Horner et al., 2010; Stein, 2010). El desarrollo de herramientas bioinformáticas es crítico para la aplicación, con éxito, de la secuenciación masiva al diagnóstico genético. Actualmente, existen programas bioinformáticos de libre acceso y *softwares* de pago que abordan pasos concretos del análisis necesario para este tipo de datos. Todas estas herramientas pueden enlazarse, vincularse o concatenarse entre sí mediante la generación de diferentes rutinas de trabajo o *pipelines*. Sin embargo, la combinación de distintas herramientas así como la elección de los parámetros adecuados en cada uno de los pasos del análisis pueden producir resultados dispares. El desarrollo y establecimiento de *pipelines* eficientes, precisos y validados que permitan establecer y garantizar unos estándares de calidad de los que obtener una información depurada y fiable y, en un tiempo prudente, es una tarea compleja.

### **II.5.3. Aplicaciones de las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos de nueva generación (NGS)**

Las técnicas de secuenciación masiva de ácidos nucleicos de nueva generación (NGS) permiten determinar el contenido genético de comunidades enteras de organismos sin un desarrollo o cultivo previo de los mismos (Thomas et al., 2012). Sus posibilidades en diversos campos de la biología no hacen sino expandirse. A continuación, se describen algunas de sus aplicaciones.

La secuenciación de genomas completos o WGS (del inglés, *Whole Genome Sequencing*) es una de las aplicaciones más extendidas de las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos de nueva generación (NGS), no solo a través del proyecto genoma humano (Consortium, 2010), sino por la secuenciación de genomas completos de organismos de todos los reinos (Genome 10K Community of Scientists, 2009). Las técnicas genéticas NGS se emplean en genética forense (Weber-Lehmann et al., 2014), en genómica aplicada a la agricultura (Poland et al., 2012) y en el diagnóstico clínico de enfermedades de transmisión genética (Kingsmore y Saunders, 2011; Saunders et al., 2012). En el diagnóstico prenatal, dichas técnicas han demostrado su eficacia en la detección de aneuploidías a partir de ADN fetal del plasma sanguíneo de la madre (Chiu et al., 2008; Fan et al., 2008). Otra importante aplicación clínica es la secuenciación genómica de microorganismos patógenos responsables de infecciones (Lipkin, 2013). Asimismo, determinar el genoma completo de microorganismos con un potencial biotecnológico elevado permite una mejor evaluación de su seguridad y potencialidades. La detección de variantes genéticas permite identificar diferencias en la secuencia de ADN de un individuo, comparado con un ADN de referencia (Koboldt et al., 2010).

Sin embargo, no siempre es necesario secuenciar genomas completos y el estudio de regiones definidas del genoma también es de gran utilidad. Recientemente, se ha descrito la secuenciación del exoma (parte del genoma formado por los exones, es decir, las partes codificantes de los genes que formarán parte de ARN mensajero maduro) como herramienta en el diagnóstico y tratamiento del cáncer (Mikhail et al., 2016; Shen et al., 2015). Asimismo, la secuenciación de amplicones de función conocida y de menor tamaño que el exoma, permite reducir el riesgo eliminar secuencias similares durante el procesamiento de las secuencias

resultantes, para detectar variantes de ese amplicón (Rehm, 2013). Igualmente, una de las aplicaciones más comunes de las técnicas de secuenciación de nueva generación es el análisis de la diversidad microbiana, basado en la comparación de secuencias del ADNr 16S que codifica el ARNr 16S de los organismos procariotas. La medida de la diversidad microbiana engloba dos aspectos, la riqueza que es el número de especies presentes en una muestra y, la distribución de la abundancia relativa de especies (Magurran, 2005). Gracias a estas metodologías se ha podido analizar la diversidad microbiana en hábitats muy diversos, lo que no hubiese sido posible determinar con técnicas genéticas anteriores (Wang et al., 2012; Logares et al., 2014; Avershina et al., 2014; Ludvigsen et al., 2015).

El análisis de células individuales para reconstruir árboles genealógicos y detectar posibles mutaciones en su ADN, también se beneficia de la utilización de las técnicas de secuenciación masiva. En este sentido, se conoce que cada célula posee una firma genética única (Frumkin et al., 2005). Este nuevo campo tiene aplicación en estudios de biología del desarrollo (Reizel et al., 2011) y en la evaluación del comportamiento y evolución de las células cancerígenas (Navin et al., 2011).

Conocer el transcriptoma a través de la secuenciación masiva de ADNc permite obtener una información global sobre el contenido de ARN de una muestra incluyendo el ARNm, ARNr, ARNt y otros ARN no codificantes que pueden tener importantes funciones biológicas (van Dijk et al., 2011; Mills et al., 2013; Siegel et al., 2014). El análisis del transcriptoma de células individuales permite conocer la dinámica metabólica celular mucho más en detalle que con las técnicas clásicas (Shalek et al., 2014; Lee et al., 2014). También se han desarrollado métodos para el estudio de subpoblaciones específicas de transcritos relacionados con procesos metabólicos anormales o patológicos (Mercer et al., 2012; Blomquist et al., 2013). La técnica ChIP-Seq combina el método de inmunoprecipitación de la cromatina con su secuenciación nucleotídica, permitiendo la identificación de las zonas de interacción entre proteínas y el ADN (Park, 2009) o el estudio de los patrones de metilación, ampliamente utilizado en la investigación sobre diferenciación celular y desarrollo de enfermedades (Masser et al., 2015).



# CAPÍTULO *CHAPTER*

## III

**ACTIVIDAD BACTERIOCINOGÉNICA, SEGURIDAD Y  
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTERIAS  
LÁCTICAS (BAL) AISLADAS DE HECES DE BUITRES  
LEONADOS (*Gyps fulvus* subsp. *fulvus*)**

---

***BACTERIOCINOGENIC ACTIVITY, SAFETY ASPECTS AND  
BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF FECAL LACTIC ACID  
BACTERIA (LAB), ISOLATED FROM GRIFFON VULTURES  
(*Gyps fulvus* subsp. *fulvus*)***

**Manuscrito enviado para su evaluación a BMC Microbiology**





# **Bacteriocinogenic activity, safety aspects and biotechnological potential of fecal lactic acid bacteria (LAB), isolated from Griffon Vultures (*Gyps fulvus* subsp. *fulvus*)**

**Sara Arbulu<sup>1</sup>, Juan J. Jiménez<sup>1</sup>, Loreto Gútiéz<sup>1</sup>, Cristina Campanero<sup>1</sup>, Rosa del Campo<sup>2</sup>, Luis M. Cintas<sup>1</sup>, Carmen Herranz<sup>1</sup>, and Pablo E. Hernández<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Avenida Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Spain

<sup>2</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, and Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias (IRYCIS), 28034 Madrid, Spain

## E-mail addresses of all authors:

Sara Arbulu : sara.arbulu@pdi.ucm.es  
 Juan José Jiménez : jjjm@vet.ucm.es  
 Loreto Gútiéz : lgutiez@vet.ucm.es  
 Cristina Campanero : ccampane@vet.ucm.es  
 Rosa del Campo : rosacampo@yahoo.com  
 Luis M. Cintas : lcintas@vet.ucm.es  
 Carmen Herranz : cherranz@vet.ucm.es  
 Pablo E. Hernández : ehernan@vet.ucm.es

## \* Corresponding author:

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Spain. Phone: +34-913943752. Fax: +34-913943743. E-mail: ehernan@vet.ucm.es

Notes: The authors declare that they have no competing interests.

Running title: Bacteriocinogenic LAB from griffon vultures

## **Abstract**

**Background:** Lactic acid bacteria (LAB) are part of the gut microbiota and produce ribosomally synthesized antimicrobial peptides or bacteriocins with interest as natural food preservatives and therapeutic agents. Bacteriocin-producing LAB are also attractive vectors for delivery of therapeutic proteins and as probiotics. Griffon vultures (*Gyps fulvus* subspecies *fulvus*) are scavenger birds with their feeding habits based almost exclusively on carrion, without vultures suffering apparent ill effects. Therefore, griffon vultures might be considered reservoirs of bacteriocin-producing LAB with potential biotechnological applications.

**Results:** Griffon vulture (*Gyps fulvus* subsp. *fulvus*) feces were screened for lactic acid bacteria (LAB) with antimicrobial activity, genes encoding bacteriocins, potential virulence determinants, susceptibility to antibiotics, genotyping and characterization of bacteriocins. In this study, 36% of LAB isolates showed antimicrobial activity being enterococci the largest LAB group with antimicrobial activity (91%) and *E. faecium* (40%) the most identified antagonistic species. Most enterococcal isolates (75%) encoded multiple bacteriocins being enterocin A (EntA) the largest identified (46%) bacteriocin. Most enterococci (88%) were resistant to multiple antibiotics. ERIC-PCR and MLST techniques permitted genotyping and recognition of the potential safety of enterococci. A multiple-step chromatographic procedure and the use of MALDI-TOF MS and N-terminal sequencing by Edman degradation and/or *de novo* sequencing by MALDI TOF/TOF tandem MS of the purified bacteriocins, permitted characterization of bacteriocins produced in supernatants of the producer cells.

**Conclusions:** Enterococci was the largest LAB group with bacteriocinogenic activity isolated from Griffon vulture feces. Furthermore, *E. faecium* M3K31 has been identified as producer of enterocin HF (EntHF), a bacteriocin with remarkable antimicrobial activity against most evaluated *Listeria* spp. and of elevated interest, primarily as a natural food preservative. *E. faecium* M3K31 would be also considered a safe probiotic strain for use in animal nutrition.

**Keywords:** Lactic acid bacteria (LAB), Antimicrobial activity, Bacteriocins, Enterococci, Virulence traits

## Background

Lactic acid bacteria (LAB) are part of the gut microbiota of mammals and birds with an important role in environmental, food and clinical microbiology. Many LAB produce ribosomally synthesized antimicrobial peptides or bacteriocins which attract considerable interest as natural and nontoxic food preservatives [1], and as therapeutic agents for human and veterinary applications and in the animal production field [2,3]. Bacteriocin-producing LAB are also considered attractive vectors for delivery of therapeutic peptides and proteins and probiotics [4-6].

Most bacteriocins produced by LAB are synthesized as biologically inactive precursors or prepeptides containing an N-terminal extension that is cleaved off during export to generate their biologically active or mature form. They are generally divided into two main classes. Class I consists of the lanthionine-containing post-translationally modified bacteriocins or lantibiotics, while class II consists of the bacteriocins containing non-modified amino acids. The class II bacteriocins may be further subdivided into the pediocin-like (class IIa) bacteriocins, the two-peptide (class IIb) bacteriocins, the cyclic (class IIc) bacteriocins, and the non-pediocin-like one peptide linear (class IId) bacteriocins [7,8]. However, additional subgroups have been suggested for leaderless peptides, circular bacteriocins, linear peptides derived from large proteins, and the glycosylated bacteriocins [9].

The food industry potentiates the use of natural preservatives whereas the misuse and overuse of antibiotics, in human and veterinary medicine and in the animal production field, has led to an ever increasing number of resistant bacteria that threatens the effective prevention and treatment of infections. Accordingly, bacteriocinogenic bacteria and their bacteriocins, specially those from LAB, emerge as a promising alternative to traditional food preservatives and antibiotic therapies [2,10]. Environmental sources as well as wild and game animals have been a powerful tool for isolation of bacteriocinogenic LAB [11-14].

Griffon vultures (*Gyps fulvus* subspecies *fulvus*) belong to the Old World vultures group, a diverse mix of colonial cliff-nesting scavenger birds that play an essential ecological role as garbage collectors and recyclers [15]. Their feeding habits are based almost exclusively on carrion, preferentially of mammals. Consequently, their gut microbiota may derive from ecological and evolutionary strategies for carrion exploitation without vultures suffering apparent ill effects. Symbiotic relationships among animal hosts and bacteria that confer protection against pathogens are widespread in nature and are considered a driving force in evolution [16]. Therefore, griffon vultures might be considered as potential reservoirs of bacteriocin-producing LAB, with potential biotechnological applications. This work constitutes a first approach on the evaluation of the antimicrobial activity and safety aspects of bacteriocinogenic LAB, isolated from griffon vulture feces.

## Methods

### Microbiological analysis, indicator strains and bacteriocinogenic assays

Fresh fecal samples from griffon vultures (*Gyps fulvus* subspecies *fulvus*) were collected from Parque Natural del Alto Tajo (Molina de Aragón, Guadalajara, Spain), and placed into sterile disposable plastic tubes at 4°C. Samples were 10-fold diluted in sterile peptone water (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) and homogenized in a stomacher. Aliquots from decimal dilutions of the homogenates were spread on duplicate plates of (i) Triptycase Soya Agar (TSA; Oxoid) at 37°C, 48 h for aerobic mesophilic counts, (ii) on de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) plates (Oxoid) at 37°C, 48 h for growth of LAB, and (iii) on Slanetz and Bartley (SB) plates (Oxoid) and Kanamycin Aesculin Azide (KAA) plates with the kanamycin selective supplement (Oxoid) at 37°C, 48 h for growth of the enterococci. The direct antimicrobial activity of selected isolates was screened by the stab-on-agar test (SOAT) [17] against three Gram-positive indicators and four Gram-negative bacteria. When stated, the antimicrobial activity of the cell-free culture supernatants was screened by an agar diffusion test (ADT) and by a microtiter plate assay (MPA) [17]. In the MPA test, one bacteriocin unit (BU) is defined as the reciprocal of the highest dilution of the bacteriocin causing 50% growth inhibition (50% of the turbidity of the control culture without bacteriocin). Supernatants were subjected to proteolytic treatment with proteinase K (Sigma-Aldrich GmbH, Madrid, Spain), at 10 mg/ml for 37°C during 2 h, to ascertain the protein nature of their antagonistic activity. After proteinase inactivation by heat treatment (100°C, 10 min), samples were assayed for residual antimicrobial activity by ADT, as described above, using *Pediococcus damnosus* CECT4797 as indicator microorganism. Strains with antimicrobial activity in their supernatants

susceptible to proteinase treatment were considered Bac<sup>+</sup> and selected for further characterization. Several indicator strains and specific bacterial growth conditions used in this study, are shown in Table 1.

### PCR analysis, DNA sequencing and other DNA manipulations

PCR amplifications were performed from total bacterial DNA obtained using the InstaGene matrix (Bio-Rad laboratories Inc., Hercules, CA, USA) in 25 or 50 µl reaction mixtures containing MyTaq mix buffer (Bioline Reagents Ltd., London, UK), 0.7 µM of each primer and 1 µl of purified DNA. Oligonucleotide primers were obtained from Sigma Genosys Ltd. (Cambridge, UK). Samples were subjected to PCR amplification in an Eppendorf Mastercycler thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). PCR products were analysed by electrophoresis on 1.5-2% (w/v) agarose (Pronadisa, Madrid, Spain) gels stained with Gel red (Biotium, CA, USA), and visualized with the Gel Doc 1000 documentation system (Bio-Rad, Madrid, Spain). HyperLadder II (Bioline GmbH, Germany) was used as a molecular size marker. When needed, the resulting PCR fragments were purified using the NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and sequenced at the Unidad de Genómica (Parque Científico de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Spain).

### Genus and species identification, and detection of bacteriocin structural genes and potential virulence factors

Selected colonies showing significant direct antagonistic activity were taxonomically identified by PCR amplification and sequencing of genes encoding 16S rRNA (16S *rDNA*) with primers plb16/mlb16 [18], and the gene encoding superoxide dismutase (*sodA*) with primers d1/d2 [19]. Genus and species identification was performed by nucleotide BLAST analysis using the NCBI platform.

The presence of structural genes of previously described bacteriocins, was evaluated in selected LAB isolates with high antimicrobial activity in their supernatants. A total of 21 bacteriocin structural genes were analysed, including (i) the pediocin-like class IIa bacteriocins avicin A (AviA), bacteriocin 31 (Bac31), bacteriocin MC4-1 (BacMC4-1), enterocin A (EntA), enterocin SE-K4 (EntSE-K4), enterocin P (EntP), hiracin JM79 (HirJM79), mundticin L (MunL) and pediocin PA-1 (PedA-1); (ii) the two-peptide class IIb bacteriocins enterocin 1071A-1071B (Ent1071A-Ent1071B) and enterocin XA-XB (EntXA-EntXB); (iii) the circular class IIc bacteriocin enterocin AS-48 (EntAS-48); (iv) the class IId non-pediocin-like one peptide linear bacteriocins including the leaderless bacteriocins enterocin L50 (EntL50A-EntL50B), enterocin JS (EntJSA-EntJSB) and enterocin Q (EntQ), and other small heat-stable linear bacteriocins such as enterocin B (EntB), enterocin 96 (Ent96), enterocin IT (EntIT), enterocin V583 (EntV583) and brevicin 925A (BreB); as well as the large bacteriolysin enterolysin A (EnlA). The references concerning bacteriocin structural genes and the specific oligonucleotide primers, PCR conditions, and positive control strains used in the PCR reactions, are shown in Table S1 of Additional file 1.

The presence of genes coding for potential virulence factors was evaluated by PCR using primer pairs designed for detection of genes *cylL<sub>L</sub>*–*cylL<sub>S</sub>* (cytolysin precursor), *cylM* (postranslational modification of cytolysin), *cylB* (transport of cytolysin), *cylA* (activation of cytolysin), *ace* (adhesin to collagen), *agg* (aggregation substance), *esp* (enterococcal surface protein), *efaAfm* and *efaAfs* (cell wall adhesins of *E. faecium* and *E. faecalis*, respectively) and *gelE-sprE* and *sprE* (gelatinase and serine protease E), as performed previously [12, 20-22]. *E. faecalis* P4 and *E. faecalis* P36 were used as reference controls for most of the assayed potential virulence genes [20].

### **Safety assessment of *E. faecium* M3K31**

The safety assessment of the *E. faecium* M3K31 isolate was determined according to guidelines from the European Food Safety Authority (EFSA) [23], including the evaluation of (i) ampicillin resistance, and (ii) determination of three genetic elements associated with hospital enterococcal strains encoding *esp*, a putative glycosyl hydrolase (*hly<sub>Efm</sub>*) and the insertion sequence *IS16*, following the methodology, specific primers, PCR conditions and control strains, as described previously [24].

### **Production of gelatinase, caseinolytic and hemolytic activity, and antibiotic susceptibility testing**

For production of gelatinase, single colonies previously grown on MRS agar (Oxoid) were streaked onto Todd-Hewitt agar (Oxoid) containing 30 g of gelatin (Oxoid) per liter, grown overnight at 37°C, and placed at 4°C for 5 h before examination of zones of turbidity around the colonies. The caseinolytic activity of the isolates was evaluated by streaking the colonies onto TSA agar (Oxoid) containing 1.5% bovine skim milk powder (Oxoid) and overnight growth at 37°C. A clear zone of hydrolysis within 24 h of growth was considered positive [11]. For investigation of haemolytic activity, strains streaked on Columbia agar supplemented with 5% (v/v) horse blood (COH, BioMérieux, Madrid, Spain) were grown at 37 °C for 1 to 2 days. Haemolysis was evidenced by the formation of clear zones surrounding the colonies on blood agar plates. The antibiotic susceptibility of the isolates was determined by overlaying antibiotic-containing disks (Oxoid) on Diagnostic Sensitivity Test Agar (Oxoid), previously seeded with approximately  $1 \times 10^5$  cfu/ml of each LAB isolate. The antibiotics tested were ampicillin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), erythromycin (15 µg), gentamicin (120 µg), nitrofurantoin (300 µg), norfloxacin (10 µg), penicillin G (10 IU), rifampicin (5 µg), teicoplanin (30 µg), tetracycline (30 µg), and vancomycin (30 µg). Inhibition zone diameters were measured after overnight incubation of the plates at 37°C. Resistance phenotypes were recorded as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [25]. *E. faecalis* ATCC29212 and *Staphylococcus aureus* ATCC25923, were used as control strains.

### **Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences (ERIC-PCR) and multilocus sequence typing (MLST) analysis**

The clonal relationship among selected *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from griffon vultures and other enterococci from food, environmental and clinical origin was evaluated by ERIC-PCR [26], as described previously [24]. The resulting patterns from ERIC-PCR were interpreted after constructing dendrograms using the unweighted-pair group method with arithmetic mean (UPGM) and the similarity on the Dice's coefficient, analyzed with the Phoretix v5.0 software (Nonlinear Dynamics Ltd., UK). For MLST analysis, purified genomic DNA from selected enterococcal isolates was used for PCR-amplification of internal fragments of seven housekeeping genes, as previously described [27]. The resulting PCR products were purified with an ExoSAP-IT PCR clean up reagent (USB Europe GmbH, Staufen, Germany) and sequenced in a ABI Prism 377 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at the Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, and Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias (IRYCIS), Madrid (Spain). Clusters of related sequence types (STs) were grouped into clonal complexes (CCs) by using eBURST (<http://www.mlst.net>).

### **Purification of bacteriocins**

The peptides responsible of the antimicrobial activity of *E. faecium* M1M10, *E. faecium* M3K31 and *E. faecium* T136 (producer of EntA) were purified to homogeneity using a multichromatographic procedure, as previously described [28,29]. Briefly, 1-L cultures of supernatants from the early stationary phase were subjected to precipitation with ammonium sulphate (50%, w/v), desalted by gel filtration (PD columns) and further subjected to cation-exchange (SP Sepharose Fast Flow) and hydrophobic-interaction (Octyl-Sepharose CL-4B) chromatographies, followed by reverse phase chromatography (PepRPC HR 5/5) in a fast-protein liquid chromatography system (ÄKTA, RP-FPLC). The most active fractions from the last chromatographic step were combined and rechromatographed on the reverse-phase column to obtain the purified bacteriocin. During purification, bacteriocin activity was calculated by the MPA with *P. damnosus* CECT4797 as the indicator microorganism. All the chromatographic columns and equipment were from GE Healthcare (Madrid, Spain).

### **Mass spectrometry analysis and amino acid sequencing**

Purified peptide fractions from the last RP-FPLC step were subjected to matrix-assisted laser desorption–ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) at the Unidad de Proteómica, Universidad Complutense de Madrid (Madrid, Spain). MALDI-TOF MS analyses were performed in a 4800 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA), operated in 1 KV reflector mode. All mass spectra were calibrated externally using a standard peptide mixture (AB Sciex, Foster City, CA, USA).

MALDI TOF/TOF tandem mass spectrometry (MS) was used to determine the partial

amino acid sequence of the purified peptide produced by *E. faecium* M3K31. Acquisition of the MS data was performed on an Ultraflex MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics Inc. Billerica, MA, USA) instrument operated in reflection mode with delayed extraction, at the Proteomics Core Facility of the Norwegian University of Life Sciences, Ås (Norway). Positively charged ions in the  $m/z$  range of 200 to 4000 were analyzed using an acceleration voltage of 25 kV and a delayed extraction (PIE) setting of 40 ns. The sample spectra were calibrated externally with a calibration standard covering the  $m/z$  range 700-3100 (Bruker Daltonics). MS/MS spectra of selected peptides were recorded using the LIFT ion optics of the mass spectrometer. Recorded spectra were processed in flexAnalysis software (v3.3, Bruker Daltonics) and mass lists submitted to database searches (via BioTools software, v 3.2, Bruker Daltonics) were performed using an in-house Mascot server (v.2.1), with the MS mass error tolerance set to 50 ppm and MS/MS fragment mass error tolerance to 0.5 Da. Global and variable modifications settings were carbamidomethyl for cysteine residues and oxidation of methionine residues, respectively. The database searched was NCBIInr, with the taxonomy set to "Other *Firmicutes*". Manual annotation of MS/MS spectra (*de novo* sequencing) was performed in flexAnalysis, using a fragment mass error tolerance of 0.5 Da. The sequences generated were searched against NCBI/taxonomy *Firmicutes* using protein BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>).

For N-terminal amino acid sequencing, the purified peptide from *E. faecium* M1M10 was subjected to automatic Edman degradation and sequence on polyvinylidene difluoride membranes (PVDF) in a Procise 494 HT Sequencing System (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's standard methods, at the Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, Madrid, Spain).

## Results

### Identification of isolates with antimicrobial activity

In this study, 406 randomly selected isolates from griffon vultures feces grown on MRS plates, 418 isolates grown in SB plates and 100 isolates grown on KAA plates, were evaluated for their direct antimicrobial activity (SOAT) against 3 Gram-positive indicators (*Pediococcus damnosus* CECT4797, *Lactococcus lactis* BB24 and *Listeria innocua* CECT910) and 4 Gram-negative bacteria (*Yersinia ruckeri* LMG3279, *Aeromonas salmonicida* LMG3776, *Campylobacter jejuni* ATCC33560 and *Campylobacter jejuni* NCTC11168). From the 924 isolates evaluated, 332 isolates (36%) showed direct antimicrobial activity against, at least, one of the Gram-positive bacterial indicators tested. However, no evidence for a direct antimicrobial activity was shown against any of the four Gram-negative bacteria tested, including the two *C. jejuni* strains. From this initial screening, 95 isolates with the largest halos of inhibition were identified by PCR amplification and sequencing of genes encoding 16S *rDNA* and *sodA*. From this, 30 *E. faecalis*, 38 *E. faecium*, 1 *E. hirae*, 1 *E. mundtii*, 5 *Lactobacillus brevis* and 1 *Lactobacillus plantarum* were identified. The remaining 19 isolates were identified as *Enterococcus spp.*



From the above cited 95 isolates, a set of 28 isolates comprising 9 *E. faecalis*, 16 *E. faecium*, 1 *E. hirae*, 1 *E. mundtii*, and 1 *Lb. brevis* were tested for the antimicrobial activity in their supernatants by an agar diffusion test (ADT) against 12 Gram-positive and 3 Gram-negative indicator bacteria. From the *E. faecalis* isolates evaluated, *E. faecalis* M2M6 and *E. faecalis* M3M42 were the most active isolates against 7 indicator bacteria. None of them were active against any of the Gram-negative indicators tested (Table 2). When supernatants from *E. faecium*, *E. hirae*, *E. mundtii* and *Lb. brevis* isolates were tested against 16 bacterial indicators, most *E. faecium* were active against most bacterial indicators, followed by those of *Lb. brevis* and *E. mundtii* M2M33, and with no antagonistic activity for *E. hirae* M4S3. Of interest is the large antimicrobial activity of *E. faecium* M3K31 against most of the bacterial indicators tested including *L. lactis* BB24, but not against *C. jejuni* ATCC33560 (Table 3). The antimicrobial activity of the most active isolates (3 *E. faecalis*, 5 *E. faecium*, 1 *E. mundtii*, and 1 *Lb. brevis*) was also evaluated against 11 *Listeria* spp. (from *L. grayii*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri*) by a microtiter plate assay (MPA). The supernatant of *E. faecium* M3K31 was remarkably active against most of the *Listeria* spp. evaluated (Table 4).

### Evaluation of bacteriocin structural genes

Purified genomic DNA of 28 LAB isolates was subjected to PCR amplification to determine the presence of structural genes coding for 21 known bacteriocins. All isolates encoded, at least, one recognized bacteriocin gene except *E. hirae* M4S3. All *E. faecalis* isolates encoded *entV583*, 6 isolates *enlA*, 5 isolates *ent1071A-ent1071B*, 2 isolates *ent96* and 2 more isolates encoded *entJSA-entJSB*. Five bacteriocin-producing genes (for *ent96*, *ent1071A-ent1071B*, *entJSA-entJSB*, *entV583*, *enlA*) were detected in *E. faecalis* M2M6 and three (for *ent1071A-ent1071B*, *entV583*, *enlA*) in *E. faecalis* M1S20. Among the *E. faecium* isolates, the *entA* gene was detected in 13 (86.6%) out of the 15 evaluated isolates and associated with the *entB* gene in 7 (53.8%) of the isolates (Table 5). The *ent96*, *entK4*, *entP* and *entXA-entXB* and *hirJM79* bacteriocin-producing genes were shown to have a lower incidence (3.5 to 17.8%) in the evaluated isolates while the *aviA*, *bac31*, *bacMC4*, *entAS48*, *entIT*, *entL50A-entL50B*, *entQ* and *munL* structural genes could not be detected in any of the evaluated isolates (Table 5).

### Potential virulence factors, antibiotic susceptibility and hemolytic activity

When selected bacteriocinogenic *E. faecalis* isolates were evaluated for potential virulence factors, the presence of the *cylL<sub>L</sub>-cylL<sub>S</sub>* genes encoding the two peptide cytolysin (hemolysin-bacteriocin) precursor was detected in three isolates. However, only *E. faecalis* PM2-13 showed the presence of the *cylLMAB* genes for expression of the cytolysin. Accordingly, only *E. faecalis* PM2-13 showed  $\beta$ -hemolytic activity when streaked on blood agar plates. Only two *E. faecalis* isolates encoded *agg* but none encoded the *esp* gene. Most *E. faecalis* isolates encoded *ace*, *gelE* and *sprE* but *E. faecalis* M1S9 and *E. faecalis* M3S1 did not encode any of the three genes (Table 6). All the evaluated *E. faecalis* strains hydrolysed gelatin and bovine casein, except those isolates not encoding *gelE-sprE*.

The results of the susceptibility to antibiotics revealed that 27 (96%) out of the 28 bacteriocinogenic LAB isolates were resistant to at least one of the tested antibiotics. Furthermore, 78% of the isolates were resistant to rifampicin, 71% to tetracycline, 46% to erythromycin, 39% to ciprofloxacin, 36% to chloramphenicol, 32% to nitrofurantoin, 28% to gentamycin and ampicillin, 25% to penicillin and 4% to vancomycin. Moreover, 88% of the enterococcal isolates showed resistance to 2-9 antibiotics. However, all isolates were sensitive to teicoplanin, *E. faecalis* M3M42 and *E. faecium* M3K31 were only resistant to rifampicin and *E. faecalis* M2M6 was sensitive to all the antibiotics tested. The genotypic evaluation of the antibiotic resistance profile was not pursued in this study.

### **Safety assessment of *E. faecium* M3K31**

When *E. faecium* M3K31 was evaluated for its sensitivity to ampicillin, as determined by a microdilution test, the minimum inhibitory concentration (MIC) was  $\leq 2$  mg/L and, thus, susceptible to ampicillin according to EFSA guidelines [23]. This isolate also showed the absence of the virulence markers *esp*, *hyl<sub>Efm</sub>* and *IS16*.

### **Molecular genotyping of selected enterococcal strains by ERIC-PCR and MLST analysis**

The ERIC-PCR fingerprints of the *E. faecalis* strains isolated from griffon vultures and those from different food, environmental and clinical origin, revealed 2 different clusters (50% similarity). The first cluster included all the isolates from griffon vulture feces and other *E. faecalis* strains, mostly from human clinical origin. The second cluster included only *E. faecalis* strains from different origins (Figure 1A). The ERIC-PCR dendrogram showing the genetic relatedness amongst the *E. faecium* isolates from different origins could be also divided into two clusters. One cluster contained 13 out of the 14 *E. faecium* isolates from griffon vultures showing 60% similarity. The second cluster grouped all the *E. faecium* isolates from different origins including *E. faecium* M4M2, isolated from griffon vultures. Among the griffon vulture isolates only *E. faecium* BS15 and *E. faecium* CS14 showed an almost identical genotype (Figure 1B).

Comparison of the resulting allelic profiles of *E. faecalis* M3M42 and M1S19 in the *E. faecalis* MLST database permitted their annotation as sequence types ST167 and ST76, respectively. On the other hand, *E. faecium* M1M10, *E. faecium* M3K31 and *E. faecium* PM1-27 were annotated as sequence types ST22, ST76 and ST670, respectively, in the *E. faecium* MLST database. Comparative eBURST analysis of the resulting sequence types (STs) permitted their location into clusters of related STs (Figure 1S, in Additional file 1).

### **Purification of bacteriocins, mass spectrometry analysis and amino acid sequencing**

Purification of the antimicrobial activity of *E. faecium* M1M10, encoding several bacteriocin structural genes, permitted a 1,397-fold increase of its specific activity and a 32% recovery of

the initial antimicrobial activity. MALDI-TOF MS of the purified peptide showed a major peak of 5,519.8 Da, suggesting the peptide was purified to homogeneity (Figure 2A). Furthermore, determination of the N-terminal amino acid sequence of the purified peptide by Edman degradation permitted identification of its 15 N-terminal amino acids as ENDHRMPNELNRPNN, which unambiguously correspond to the N-terminal sequence of enterocin B (EntB). However, EntB has a calculated theoretical molecular mass of 5,465.2 Da. Purification of the antagonistic activity of *E. faecium* M3K31 encoding the *entP* gene, permitted an 897-fold increase of its specific activity and a 11% recovery of the initial antimicrobial activity. MALDI-TOF MS analysis of the purified peptide showed a major peak of 4,328.1 Da. Furthermore, *de novo* amino acid sequencing of the resulting peptide by MALDI TOF/TOF tandem MS permitted identification of the carboxy-terminal (y-ion series) 27-residue peptide SVDWGKAIGIIGNNAAANLTTGGKAGW and the amino-terminal (b-ion series) 14-residue peptide AAANLTTGGKAGWK (Figure 2B), identical to the C-terminal amino acid sequence of enterocin HF (EntHF) (GenBank accession numbers P86183 and KJ442693), and with a theoretical molecular mass of 4,330.9 Da. Primers devised from the nucleotide sequence of EntHF from GenBank accession number KJ442693 and PCR amplifications and sequencing of the resulting fragments, confirmed that *E. faecium* M3K31 encoded *entHF*.

#### **Antimicrobial activity of purified enterocin A (EntA) and enterocin HF (EntHF) against *Listeria* spp.**

The sensitivity of several *Listeria* ssp. against purified EntA and EntHF is shown in Table 7. Purified EntHF showed a higher specific antimicrobial activity against *Listeria* spp. than purified EntA. *L. ivanovii* CECT913 was the most sensitive indicator strain for both bacteriocins.

#### **Discussion**

Among other features, most bacteria produce compounds that inhibit competing and pathogenic microorganisms, improving host health [7,30]. Since griffon vultures feed regularly on carcasses from dead birds and mammals, it may be hypothesized that vultures could benefit themselves hosting bacteriocin-producing LAB to combat bacterial pathogens. In this study, 36% (332 out of 924) of isolates recovered from griffon vultures feces and selected after growth on selective media for LAB and enterococci, displayed direct antimicrobial activity. The enterococci comprised the largest LAB group with antimicrobial activity (91%) with *E. faecium* (40%), *E. faecalis* (31%), *E. hirae* (1%), *E. mundtii* (1%), yet unidentified enterococci (20%), *Lb. brevis* (5%) and *Lb. plantarum* (1%), as the active antimicrobial isolates. Enterococci with antimicrobial activity have been previously identified from LAB isolated from mammals, birds and fish [13,14,31,32], but not with this elevated percentage (91%) of isolation. The enterococci are also the most common species in cloacal and pharyngeal samples of Euroasian griffon vultures [33] and in Turkey and Black vultures [34] whereas enterococcal symbionts living in the hoopoe (*Upua epops*) uropygial gland produce bacteriocins active against Gram-positive pathogens [35]. Thus, LAB with

antimicrobial activity in griffon vulture feces seems to be mainly composed by bacteriocinogenic enterococci.

In this work none of the LAB isolated from griffon vultures showed antagonistic activity against any of the four Gram-negative indicator bacteria evaluated, including two *C. jejuni* strains. Since griffon vultures are not a reservoir for *Campylobacter* spp. [33,36], perhaps bacteria different than LAB may inhibit or control their presence in this reservoir. A number of bacteriocins, produced by lactobacilli and enterococci of avian origin, have unexpectedly been described as having antimicrobial activity against *C. jejuni* [37]. Yet, they have not been biochemically characterized and/or biologically active produced by heterologous microbial hosts [3,37]. However, some nonribosomal lipopeptides produced by *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. show antagonistic activity against *C. jejuni* [37]. Thus, these bacteria would be further investigated for their antimicrobial activity against *C. jejuni*, not only in griffon vultures but in a larger number of animal and food reservoirs [38].

When selected LAB were evaluated for antimicrobial activity in their supernatants, the *E. faecalis* isolates (Table 2) were less active than *E. faecium* and other LAB isolates (Table 3), which has been observed from enterococci from other sources [12,14,39]. But of interest is the large antimicrobial activity of *E. faecium* M3K31 against most bacterial indicators, including *L. lactis* BB24 (Table 3). Furthermore, *E. faecium* M3K31 was also remarkably active against most of the *Listeria* spp. evaluated (Table 4).

Bacteriocin production is also a desirable probiotic trait [5,40]. In this study, all *E. faecalis* isolates encoded *entV583* while *E. faecalis* M2M6 encoded five bacteriocin structural genes and *E. faecalis* M1S20 three bacteriocin structural genes. Among the *E. faecium* isolates, the *entA* gene was detected in 86.6% of the isolates with *E. faecium* M1M10 encoding up to 5 bacteriocin-producing genes. However, *E. faecium* M3K31, encoding only *entP*, was the most potent isolate with antimicrobial activity (Table 5). Accordingly, is difficult to find a correlation between the presence of bacteriocin structural genes and the antagonistic activity and antimicrobial spectrum of the isolates. It may be hypothesized that bacteriocin-producing genes may be silent [12], that modifications in the promoter region may affect transcription, and that immunity/regulation/transport of the synthesized bacteriocin may also be impaired [11,12]. Furthermore, the phenotypic and genetic diversity between enterococcal producers may, not only, affect the production but the antimicrobial activity of the enterocins produced [41]. The production of bacteriocins is also regulated by environmental factors such as temperature [42]. Accordingly, the occurrence of several enterocin structural genes in *E. faecalis* and *E. faecium* does not always correlate with a larger bacteriocin activity in their supernatants [12]. Nevertheless, the presence of structural bacteriocin-producing genes, either alone or in combination with others, seems to be common in bacteriocinogenic enterococci from human, animal, clinical, food, agricultural and environmental sources [12,14].

The enterococci are LAB with a beneficial role in the sensory characteristics of fermented foods and have been successfully used as starter and adjunct cultures, and

permitted as probiotics [43]. However, the enterococci are also gastrointestinal (GI) tract colonizers responsible of nosocomial and, to a lesser extent, community acquired infections [44]. It has been reported that *E. faecalis* harbours significantly more virulence determinants than *E. faecium* [12,20] and, therefore, we screened the bacteriocinogenic *E. faecalis* isolates for presence of virulence determinants. Only *E. faecalis* PM2-13 amplified the *cylLMAB* genes for expression of the two-peptide cytolysin (hemolysin-bacteriocin) (Table 6). Insertion/deletion events leading to truncated or absent *cyl* genes and possible sequence divergences in genes coding the structural subunits of the cytolysin may explain the difficulties to tackle genes involved in the production of active cytolysins. Most *E. faecalis* isolates encoded an adhesin to collagen (*ace*), an important element in the initial stage of infection, and the extracellular metalloendopeptidases *gelE* and *sprE*. However, *E. faecalis* M1S9 and *E. faecalis* M3S1 did not encode either *ace* nor the protease-producing genes. Protease expression seems to be strain specific and not representative of the clinical isolates although the regulatory *fsrABCD* genes must be also active, to permit protease expression [45]. None of the *E. faecalis* evaluated encoded the enterococcal surface protein (*esp*), and this is considered a positive attribute since Esp is supposed to promote primary attachment to surfaces and escape from the immune system.

Enterococci are commonly resistant to macrolides, cephalosporins and tetracycline and often exhibit high-level resistance to gentamicin [46]. In this study, 88% of the enterococcal isolates showed resistance to 2-9 antibiotics. However, all isolates were sensitive to teicoplanin, whereas *E. faecalis* M3M42 and *E. faecium* M3K31 were only resistant to rifampicin. Vultures rely greatly on food found at garbage dumps [15] which usually derives from medicated livestock that could lead vultures to the acquisition of antimicrobial-resistant bacteria [47], modification of the normal microbiota and acquisition of pathogenic bacteria [48]. But, still some *E. faecalis* and *E. faecium* isolates do not hold a large antimicrobial resistance. Moreover, *E. faecium* M3K31 was susceptible to ampicillin and did not encode the virulence markers *esp*, *hyl<sub>Efm</sub>* and *IS16* being considered, according to EFSA guidelines [23], a safe probiotic for use in animal nutrition.

The virulence of the enterococci also reflects a selection for specific variants or clones with enhanced pathogenic potential [49]. The epidemiological typing of *E. faecalis* and *E. faecium* has mainly been performed by ERIC-PCR and MLST analysis. As expected, *E. faecalis* strains from griffon vulture feces showed a distinct genetic relatedness among them and from other strains from food, clinical and environmental origin, when evaluated by ERIC-PCR (Figure 1A). However, the *E. faecium* strains formed a more conserved, but also distinct group as compared to enterococcal isolates from different origins (Figure 1B). These results suggest the reliability of ERIC-PCR for genotyping enterococci and, very likely, for their specific monitoring.

Previous MLST studies have demonstrated the association between specific clonal complexes and human nosocomial infections for *E. faecalis* [27,50] and *E. faecium* [44]. Indeed, the majority of hospital-derived isolates of *E. faecalis* cluster in two clonal complexes, CC2 and CC9. However, in *E. faecium* a population represented by the MLST

sequence types ST17, ST18, ST78 and ST192 which were previously designated clonal complex CC17, constitutes a hospital-associated clade genetically distinct from most commensal isolates [44,49]. The MLST analysis of *E. faecalis* M3M42 and *E. faecalis* M1S19 identified both strains with the sequence types ST167 and ST76, respectively, none of them included into the clonal complexes CC2 and CC9 represented by sequence types ST6 and ST9, respectively (Figure S1). In this context, *E. faecalis* M3M42 sensitive to most antibiotics, free of most virulence determinants and encoding *gelE-sprE* with gelatinase activity, could be considered a potential strain for production of bioactive peptides with antihypertensive and antioxidant activity, during its growth on bovine skim milk [51,52]. The MLST analysis of the *E. faecium* isolates shows that while *E. faecium* M1M10 (ST22) and *E. faecium* PM1-27 (ST670) remain close to strains from a hospital-associated clade, the strain of *E. faecium* M3K31 (ST176) remains distant from those of the clonal complex CC17 and, thus, is considered a safer isolate (Figure S1 in Additional file 1).

For bacteriocinogenic isolates the possibility exists for their antimicrobial activity being mediated by still unknown or not yet described bacteriocins or by regulation of the production of multiple encoded bacteriocins. In this study, MALDI-TOF MS analysis of the purified supernatant of *E. faecium* M1M10 encoding several bacteriocin structural genes permitted the identification of a major peptide fragment of 5,519.8 Da (Figure 2A). However, determination of its N-terminal amino acid sequence by Edmann degradation permitted their unambiguous recognition as the N-terminal sequence of EntB, with a theoretical molecular mass of 5,465.2 Da [53]. The difference in 54 Da between the obtained and the calculated molecular mass of the EntB, may be ascribed to still unknown postranslational modifications. Furthermore, the absence of other major peptide fragments in the purified activity of *E. faecium* M1M10, may imply that: (i) other encoded bacteriocins are produced in much lower concentrations, (ii) their structural genes remain silent and/or (iii) their production is regulated by still unknown mechanisms [12,42].

On the other hand, MALDI-TOF MS analysis of the purified supernatant of *E. faecium* M3K31 with antimicrobial activity against *L. lactis* BB24, a LAB species known for its very low or non-inhibition by class IIa bacteriocins [9,39,54], permitted the identification of a major peptide fragment of 4,328.1 Da (Figure 2B). Furthermore, the *de novo* amino acid sequencing of the purified peptide by MALDI TOF/TOF tandem MS, permitted the identification of a 27- and 14-residue peptide (Figure 2C), identical to the C-terminal amino acid sequence of the bacteriocin EntHF, produced by *E. faecium* isolates of different origin (GenBank accession numbers P86183 and KJ442693). The difference between the measured (4,228.1 Da) and the calculated (4,330.9 Da) molecular mass of EntHF, suggests the existence of a disulfide bond linking the two known cysteine residues in the molecule. In this context, mature EntHF is 91% identical to mundticin KS/enterocin CRL35 [55-57] and 90% identical to mundticin L [57] and avicin A [58]. These bacteriocins display a high antilisterial activity, and enterocin CRL35 has even been postulated as a promising alternative agent for the *in vivo* prevention of *Listeria* spp. infections [59]. The absence of the bacteriocin EntP in the purified peptide fraction from *E. faecium* M3K31, imply that further studies on the regulation of the expression of bacteriocin structural genes in bacteriocinogenic enterococci would be pursued.

The specific antimicrobial activity of purified EntA and EntHF against *Listeria* spp. was 0.4- to 175-fold higher for EntHF as compared to EntA, with *L. ivanovii* CECT913 as the most sensitive strain ( $4.3 \times 10^5$ -fold) (Table 7). Thus, although EntA is one of the most potent class IIa bacteriocins [60], EntHF is even more potent than EntA against *Listeria* spp. The recent determination of the solution structure of EntHF, produced by *E. faecium* M3K31, shows that this bacteriocin adopts an antiparallel  $\beta$ -sheet structure in the N-terminal region followed by a well-defined central  $\alpha$ -helix and a more disordered C-terminal end, fitting emerging facts regarding target recognition and mode of action of class IIa bacteriocins [61]. Apparently, the  $\beta$ -sheet-like N-terminal domain mediates initial binding to the target cell whereas the helix-containing C-terminal half penetrates into the hydrophobic core of target-cell membranes, docks to domains of specific protein receptors and causes disruption of membrane integrity, leakage of solutes, and death of sensitive cells [62,63].

The C-terminal domains of class IIa bacteriocins are also involved in specific recognition by their cognate immunity proteins and in determining their antimicrobial spectra. Modifications of the amino acid composition of the C-terminal end of class IIa bacteriocins may alter the manner and/or extent to which bacteriocins interact with putative or cognate receptors and even with cognate immunity proteins in the membrane of target cells [9]. This would explain why the antimicrobial spectra of similar class IIa bacteriocins and the susceptibility of sensitive cells to a given bacteriocin, varies much more than would be expected from their known amino acid sequences. Accordingly, EntHF may be considered a bacteriocin of elevated potential biotechnological interest primarily as a natural food preservative and a therapeutic antimicrobial agent for human and veterinary applications. Furthermore, because EntHF is a primary metabolite of a linear peptidic nature, it may be considered suitable for the development of novel bacteriocin quimeras with increased target specificity and antimicrobial activity by peptide bioengineering.

Within LAB, enterococci are increasingly used as probiotics. Most probiotics enhance intestinal barrier function, display immunomodulatory activity and exert protective effects against pathogens due to production of antimicrobial compounds [4,64]. *E. faecium* M3K31 meets the EFSA requirements to be considered a safe probiotic in animal nutrition [23]. Moreover, the elucidation of the draft genome of *E. faecium* M3K31 has confirmed the presence of the EntHF biosynthetic cluster, the enterocin P structural and immunity genes, and the gene encoding a bacteriocin which resembles (85% identity) a putative antimicrobial peptide named SRCAM 602 [65]. Accordingly, *E. faecium* M3K31 producing EntHF and free of potential virulence markers, would be considered as a potential and valuable probiotic for diverse biotechnological applications.

## Conclusions

This study has determined that enterococci is the largest LAB group with bacteriocinogenic activity, isolated from griffon vulture feces. However, the absence of LAB with antagonistic activity against Gram-negative bacteria including *C. jejuni* suggest that bacteria, other than LAB, would be investigated for their antimicrobial activity against this foodborne pathogen. Most enterococci encoded multiple bacteriocins. However, it is difficult to find a correlation

between the presence of bacteriocin structural genes and the antagonistic activity and antimicrobial spectrum of the isolates. Determination of the genetic relatedness and allelic profile of the enterococci permitted their genotyping and recognition of their safety. In this context, *E. faecalis* M3M42 (ST167) and *E. faecium* M3K31 (ST176) were considered free from most virulent determinants and genetically distinct from hospital-associated virulent strains. Moreover, *E. faecium* M3K31 has been identified as producer of EntHF, a bacteriocin with remarkable antimicrobial activity against most evaluated *Listeria* spp. and elevated interest, primarily as a natural food preservative. *E. faecium* M3K31, susceptible to ampicillin and absent of defined virulent markers, would be also considered a safe probiotic strain for use in animal nutrition.

## Declarations

### List of abbreviations

ADT: agar diffusion test; BLAST: Basic local alignment search tool; CC: Clonal complex; CLSI: Clinical and laboratory standards institute; EFSA: European food safety authority; ERIC-PCR: Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences- Polymerase chain reaction; KAA: Kanamycin aesculin azide; LAB: Lactic acid bacteria; MALDI-TOF MS: Matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry; MALDI TOF/TOF MS: MALDI TOF tandem mass spectrometry; MIC: Minimum inhibitory concentration; MLST: Multilocus sequence typing; MPA: Microtiter plate assay; MRS: de Man, Rogosa and Sharpe; NCBI: National center for biotechnology information; PCR: Polymerase chain reaction; RP-FPLC: Reverse phase-Fast protein liquid chromatography SB: Slanetz and Bartley; SOAT: Stab-on-agar test; TSA: Trypticase soy agar; UPGM: Unweighed-pair group method.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Authors' contributions

SA carried out the microbiological and genetic analyses, purification and biochemical characterization of the bacteriocins, participated in the design of the experiments and prepared the manuscript draft. JJJ, LG and CC participated in the microbiological and genetic analyses. RDC participated in the design and analysis of genotypic data. CH, LMC and PEH participated in the coordination and design of the study, analyzed the results and revised the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

### Authors' details

<sup>1</sup> Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Avenida Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Spain. <sup>2</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, and



Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias (IRYCIS), 28034 Madrid, Spain.

### Acknowledgements

We acknowledge the forest police officers of Parque Natural del Alto Tajo (Guadalajara, Spain) and, specially, to Mr. Cristóbal Mateo González for collecting the griffon vulture feces. The authors are grateful to Prof. IF Nes, Prof. DB Diep and Dr. M Skaugen from the Norwegian University of Life Sciences (Norway) for help in the amino acid sequencing of EntHF. This work was partially supported by Project AGL2012-34829 from Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), by Grant GR314 from BSCH-UCM, and by Grant S2013/ABI-2747 from the Comunidad de Madrid (CAM). SA and JJJ held a fellowship (FPI) from the MINECO, LG held a fellowship (FPU) from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) and CC held a predoctoral fellowship from Universidad Complutense de Madrid (UCM), Spain

### References

1. O'Connor PM, Ross RP, Hill C, Cotter PD. Antimicrobial antagonists against food pathogens: a bacteriocin perspective. *Curr. Opin. Food Sci.* 2015;2:51–7.
2. Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* 2013;11:95–105.
3. Arbulu S, Jiménez JJ, Gútierez L, Cintas LM, Herranz C, Hernández PE. Cloning and expression of synthetic genes encoding the broad antimicrobial spectrum bacteriocins SRCAM 602, OR-7, E-760, and L-1077, by recombinant *Pichia pastoris*. *BioMed Res. Int.* 2015 :767183.
4. Corr SC, Hill C, Gahan CGM. Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens. *Adv. Food Nutr. Res.* 2009;56:1–15.
5. Dobson A, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl. Environ. Microbiol.* 2012;78:1–6.
6. Jiménez JJ, Diep DB, Borrero J, Gútierez L, Arbulu S, Nes IF, et al. Cloning strategies for heterologous expression of the bacteriocin enterocin A by *Lactobacillus sakei* Lb790, *Lb. plantarum* NC8 and *Lb. casei* CECT475. *Microb. Cell Factories.* 2015;14:166.
7. Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005;3:777–88.
8. Nes IF, Diep DB, Ike Y. Enterococcal Bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to niche control. In: Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N. (Eds.), *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston.
9. Kjos M, Borrero J, Opsata M, Birri DJ, Holo H, Cintas LM, et al. Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology* 2011;157:3256–67.
10. Joerger RD. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poult. Sci.* 2003;82:640–7.
11. Martín M, Gutiérrez J, Criado R, Herranz C, Cintas LM, Hernández PE. Chimeras of mature pediocin PA-1 fused to the signal peptide of enterocin P permits the cloning,

- production, and expression of pediocin PA-1 in *Lactococcus lactis*. J. Food Prot. 2007;70:2792–8.
12. Sánchez J, Basanta A, Gómez-Sala B, Herranz C, Cintas LM, Hernández PE. Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). Int. J. Food Microbiol. 2007;117:295–305.
  13. Muñoz-Atienza E, Gómez-Sala B, Araújo C, Campanero C, del Campo R, Hernández PE, et al. Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of Lactic Acid Bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. BMC Microbiol. 2013;13:15.
  14. Gómez-Sala B, Muñoz-Atienza E, Sánchez J, Basanta A, Herranz C, Hernández PE, et al. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from fish, seafood and fish products. Eur. Food Res. Technol. 2015;241:341–56.
  15. Margalida A, Colomer MA. Modelling the effects of sanitary policies on European culture conservation. Sci. Rep. 2012;2:753.
  16. Ruiz-Rodríguez M, Soler JJ, Martín-Vivaldi M, Martín-Platero AM, Méndez M, Peralta-Sánchez JM, et al. Environmental factors shape the community of symbionts in the hoopoe uropygial gland more than genetic factors. Appl. Environ. Microbiol. 2014;80:6714–23.
  17. Cintas LM, Casaus P, Fernández MF, Hernández PE. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. Food Microbiol. 1998;15:289–98.
  18. Kullen MJ, Sanosky-Dawes RB, Crowell DC, Klaenhammer TR. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. J. Appl. Microbiol. 2000;89:511–6.
  19. Poyart C, Quesne G, Boumaila C, Trieu-Cuot P. Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the *sodA* gene as a target. J. Clin. Microbiol. 2001;39:4296–301.
  20. Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Appl. Environ. Microbiol. 2001;67:1628–35.
  21. Nakayama J, Cao Y, Horii T, Sakuda S, Akkermans AD, de Vos WM, et al. Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*. Mol. Microbiol. 2001;41:145–54.
  22. Duprè I, Zanetti S, Schito AM, Fadda G, Sechi LA. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in sardinia (Italy). J. Med. Microbiol. 2003;52:491–8.
  23. EFSA Panel on Additives and Products or Substances Used in Animal Feed (FEEDAP). Guidance on the safety assessment of *Enterococcus faecium* in animal nutrition. EFSA J. 2012;10(5):2682.
  24. Muñoz-Atienza E, Araújo C, Campo R del, Hernández PE, Herranz C, Cintas LM. Safety assessment and molecular genetic profiling by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and PCR-based techniques of *Enterococcus faecium* strains of food origin. LWT - Food Sci. Technol. 2016;65:357–62.

25. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Wayne, PA, USA: CLSI; 2014.
26. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:6823–31.
27. Ruiz-Garbajosa P, Bonten MJM, Robinson DA, Top J, Nallapareddy SR, Torres C, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44:2220–8.
28. Martín M, Gutiérrez J, Criado R, Herranz C, Cintas LM, Hernández PE. Cloning, production and expression of the bacteriocin enterocin A produced by *Enterococcus faecium* PLBC21 in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007;76:667–75.
29. Borrero J, Brede DA, Skaugen M, Diep DB, Herranz C, Nes IF, et al. Characterization of garvicin ML, a novel circular bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, Isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Appl. Environ. Microbiol.* 2011;77:369–73.
30. Soler JJ, Martín-Vivaldi M, Peralta-Sánchez JM, Ruiz-Rodríguez M. Antibiotic-producing bacteria as a possible defence of birds against pathogenic microorganisms. *Open Ornithol. J.* 2010;3:93–100.
31. Sánchez J, Basanta A, Gómez-Sala B, Herranz C, Cintas LM, Hernández PE. Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int. J. Food Microbiol.* 2007;117:295–305.
32. Araújo C, Muñoz-Atienza E, Nahuelquín Y, Poeta P, Igrejas G, Hernández PE, et al. Inhibition of fish pathogens by the microbiota from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and rearing environment. *Anaerobe* 2015;32:7–14.
33. Vela AI, Casas-Díaz E, Fernández-Garayzábal JF, Serrano E, Agustí S, Porrero MC, et al. Estimation of cultivable bacterial diversity in the cloacae and pharynx in Eurasian griffon vultures (*Gyps fulvus*). *Microb. Ecol.* 2015;69:597–607.
34. Roggenbuck M, Schnell IB, Blom N, Bælum J, Bertelsen MF, Sicheritz-Pontén T, et al. The microbiome of New World vultures. *Nat. Commun.* 2014;5:5498.
35. Rodríguez-Ruano SM, Martín-Vivaldi M, Martín-Platero AM, López-López JP, Peralta-Sánchez JM, Ruiz-Rodríguez M, et al. The hoopoe's uropygial gland hosts a bacterial community influenced by the living conditions of the bird. *PLoS One* 2015;10(10):e0139734.
36. Marin C, Palomeque MD, Marco-Jiménez F, Vega S. Wild griffon vultures (*Gyps fulvus*) as a source of *Salmonella* and *Campylobacter* in Eastern Spain. *PLOS One.* 2014;9:e94191.
37. Lohans CT, van Belkum MJ, Li J, Vederas JC. Characterization of bacterial antimicrobial peptides active against *Campylobacter jejuni*. *Can. J. Chem.* 2014;93:381–8.
38. Lee M-H, Lee J, Nam Y-D, Lee JS, Seo M-J, Yi S-H. Characterization of antimicrobial lipopeptides produced by *Bacillus* sp. LM7 isolated from *chungkookjang*, a Korean traditional fermented soybean food. *Int. J. Food Microbiol.* 2016;221:12–8.

39. Martín M, Gutiérrez J, Criado R, Herranz C, Cintas LM, Hernández PE. Genes encoding bacteriocins and their expression and potential virulence factors of enterococci isolated from wood pigeons (*Columba palumbus*). J. Food Prot. 2006;69:520–31.
40. O'Shea EF, Cotter PD, Stanton C, Ross RP, Hill C. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. Int. J. Food Microbiol. 2012;152:189–205.
41. Borrero J, Jiménez JJ, Gútierez L, Herranz C, Cintas LM, Hernández PE. Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A in lactic acid bacteria. J. Biotechnol. 2011;156:76–86.
42. Criado R, Gutiérrez J, Martín M, Herranz C, Hernández PE, Cintas LM. Immunochemical characterization of temperature-regulated production of enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), enterocin P, and enterocin Q by *Enterococcus faecium* L50. Appl. Environ. Microbiol. 2006;72:7634–43.
43. Franz CMAP, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, Gálvez A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. Int. J. Food Microbiol. 2011;151:125–40.
44. Willems RJL, Top J, van Schaik W, Leavis H, Bonten M, Sirén J, et al. Restricted gene flow among hospital subpopulations of *Enterococcus faecium*. mBio. 2012;3:e00151–00112.
45. Pessione A, Lamberti C, Cocolin L, Campolongo S, Grunau A, Giubergia S, et al. Different protein expression profiles in cheese and clinical isolates of *Enterococcus faecalis* revealed by proteomic analysis. Proteomics 2012;12:431–47.
46. Hollenbeck BL, Rice LB. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. Virulence 2012;3:421–33.
47. McEwen SA, Fedorka-Cray PJ. Antimicrobial Use and resistance in animals. Clin. Infect. Dis. 2002;34:S93–106.
48. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. Physiol. Rev. 2010;90:859–904.
49. Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. Nat. Rev. Microbiol. 2012;10:266–78.
50. Galloway-Peña JR, Rice LB, Murray BE. Analysis of PBP5 of early U.S. isolates of *Enterococcus faecium*: sequence variation alone does not explain increasing ampicillin resistance over time. Antimicrob. Agents Chemother. 2011;55:3272–7.
51. Gútierez L, Borrero J, Jiménez JJ, Gómez-Sala B, Recio I, Cintas LM, et al. Genetic and biochemical evidence that recombinant *Enterococcus* spp. strains expressing gelatinase (GelE) produce bovine milk-derived hydrolysates with high angiotensin converting enzyme-inhibitory activity (ACE-IA). J. Agric. Food Chem. 2014;62:5555–64.
52. Gútierez L, Gómez-Sala B, Recio I, del Campo R, Cintas LM, Herranz C, et al. *Enterococcus faecalis* strains from food, environmental, and clinical origin produce ACE-inhibitory peptides and other bioactive peptides during growth in bovine skim milk. Int. J. Food Microbiol. 2013;166:93–101.
53. Casaus P, Nilsen T, Cintas LM, Nes IF, Hernández PE, Holo H. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. Microbiology 1997;143:2287–94.

54. Ramnath M, Arous S, Gravesen A, Hastings JW, Héchard Y. Expression of mptC of *Listeria monocytogenes* induces sensitivity to class IIa bacteriocins in *Lactococcus lactis*. Microbiol. Read. Engl. 2004;150:2663–8.
55. Kawamoto S, Shima J, Sato R, Eguchi T, Ohmomo S, Shibato J, et al. Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. Appl. Environ. Microbiol. 2002;68:3830–40.
56. Saavedra L, Minahk C, de Ruiz Holgado AP, Sesma F. Enhancement of the enterocin CRL35 activity by a synthetic peptide derived from the NH<sub>2</sub>-terminal sequence. Antimicrob. Agents Chemother. 2004;48:2778–81.
57. Feng G, Guron GKP, Churey JJ, Worobo RW. Characterization of mundticin L, a class IIa anti-*Listeria* bacteriocin from *Enterococcus mundtii* CUGF08. Appl. Environ. Microbiol. 2009;75:5708–13.
58. Birri DJ, Brede DA, Forberg T, Holo H, Nes IF. Molecular and genetic characterization of a novel bacteriocin locus in *Enterococcus avium* isolates from infants. Appl. Environ. Microbiol. 2010;76:483–92.
59. Salvucci E, Saavedra L, Hebert EM, Haro C, Sesma F. Enterocin CRL35 inhibits *Listeria monocytogenes* in a murine model. Foodborne Pathog. Dis. 2012;9:68–74.
60. Ennahar S, Sashihara T, Sonomoto K, Ishizaki A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiol. Rev. 2000;24:85–106.
61. Arbulu S, Lohans CT, van Belkum M, Cintas LM, Herranz C, Vederas JC, Hernández PE. Solution structure of enterocin HF, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* M3K31. J. Agric. Food Chem. 2015;63:10689–95.
62. Diep DB, Skaugen M, Salehian Z, Holo H, Nes IF. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007;104:2384–9.
63. Kjos M, Salehian Z, Nes IF, Diep DB. An extracellular loop of the mannose phosphotransferase system component IIC is responsible for specific targeting by class IIa bacteriocins. J. Bacteriol. 2010;192:5906–13.
64. Riboulet-Bisson E, Sturme MHJ, Jeffery IB, O'Donnell MM, Neville BA, Forde BM, et al. Effect of *Lactobacillus salivarius* bacteriocin Abp118 on the mouse and pig intestinal microbiota. PloS One 2012;7:e31113.
65. Arbulu S, Frantzen C, Lohans CT, Cintas LM, Herranz C, Holo H, et al. Draft genome sequence of the bacteriocin-producing strain *Enterococcus faecium* M3K31, isolated from griffon vultures (*Gyps fulvus* subsp. *fulvus*). Genome Announc. 2016;4(2):e00055-16.
66. Balla E, Dicks LM, Du Toit M, Van Der Merwe MJ, Holzapfel WH. Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. Appl. Environ. Microbiol. 2000;66:1298–304.
67. Joosten HM, Nunez M, Devreese B, Van Beeumen J, Marugg JD. Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA 4. Appl. Environ. Microbiol. 1996;62:4220–3.
68. Jacob AE, Hobbs SJ. Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. J. Bacteriol. 1974;117:360–72.

69. Sahm DF, Kissinger J, Gilmore MS, Murray PR, Mulder R, Solliday J, et al. *In vitro* susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Antimicrob. Agents Chemother. 1989;33:1588–91.
70. Cintas LM, Casaus P, Holo H, Hernandez PE, Nes IF, Håvarstein LS. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. J. Bacteriol. 1998;180:1988–94.
71. Cintas LM, Casaus P, Håvarstein LS, Hernández PE, Nes IF. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. Appl. Environ. Microbiol. 1997;63:4321–30.
72. Rodríguez J M, Cintas L M, Casaus P, Horn N, Dodd HM, Hernández PE, et al. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. J. Appl. Bacteriol. 1995;78:109–15.
73. Martínez JM, Martínez MI, Suárez AM, Herranz C, Casaus P, Cintas LM, et al. Generation of polyclonal antibodies of predetermined specificity against pediocin PA-1. Appl. Environ. Microbiol. 1998;64:4536–45.
74. Gómez-Sala, B. (2006). MSc. Thesis. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, Spain.
75. Citti, R. (2005). Aislamiento e identificación de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de leches y quesos de búfala de Venezuela: actividad antimicrobiana y caracterización bioquímica y genética de sus bacteriocinas. PhD. Thesis. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, Spain.
76. Cintas LM, Casaus P, Herranz C, Håvarstein LS, Holo H, Hernández PE, et al. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. J. Bacteriol. 2000;182:6806–14.
77. Campanero C, Brandao A, Almeida T, Igrejas G, Poeta P, Hernandez PE, Herranz C, Cintas LM. Enterocin HF, a new pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* strains of human and fish origin. Submitted (FEB-2014) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.

### Further declarations

### Ethics approval and consent to participate, consent for publication, availability of data and material, and funding

The authors declare that they have accomplished these questions following the recommendations provided by the editorial office.

**Table 1.** Most indicator species and specific bacterial growth conditions used in this study

Organism	Origin/Reference <sup>a</sup>	Growth conditions	
		Medium	T (°C)
Gram-positive			
<i>Enterococcus faecalis</i>			
BFE 1071	Balla <i>et al.</i> , (2000) [66]	MRS	37
DAC9	DNBTA [12]	MRS	37
DBH18	DNBTA [12]	MRS	37
INIA 4	INIA [67]	MRS	37
JH2-2	HRC [68]	MRS	37
P4	IFR [20]	MRS	37
V583	LMG [69]	MRS	37
<i>Enterococcus faecium</i>			
L50	DNBTA [70]	MRS	37
M3K31	This work	MRS	37
P13	DNBTA [71]	MRS	37
T136	DNBTA [53]	MRS	37
<i>Enterococcus hirae</i> DCH5	DNBTA [12]	MRS	37
<i>Lactobacillus sakei</i> 2714	NCDO	MRS	37
<i>Lactococcus lactis</i> BB24	DNBTA [72]	MRS	37
<i>Listeria innocua</i> 910	CECT	BHI	37
<i>Listeria monocytogenes</i> 4032	CECT	BHI	37
<i>Pediococcus acidilacti</i> 347	DNBTA [73]	MRS	32
<i>Pediococcus damnosus</i> 4797	CECT	MRS	32
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ATCC	MRS	32
Gram-negative			
<i>Aeromonas salmonicida</i> 3776	LMG	TSB	28
<i>Campylobacter jejuni</i> 33560	ATCC	BHI + 1% horse serum	37
<i>Campylobacter jejuni</i> 11168	NCTC	BHI + 1% horse serum	37
<i>Yersinia ruckeri</i> 3279	LMG	TSB	28

<sup>a</sup>Reference abbreviations: ATCC, American Type Culture Collection, VA, USA; CECT, Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, Spain; DNBTA, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain; HRC, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias (IRYCIS), Madrid, Spain; IFR, Institute of Food Research, Norwich, UK; INIA, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid, Spain; LMG, Laboratorium voor Microbiologie, University of Ghent, Ghent, Belgium; NCDO, National Collection of Dairy Organisms, Aberdeen, Scotland, UK; NCTC, National Collection of Type Type Cultures, Salisbury, UK.

**Table 2.** Antimicrobial activity<sup>a</sup> of supernatants from selected *E. faecalis* isolates

Isolate	Indicator microorganisms <sup>b</sup>														
	BFE 1071	DAC9	DBH9	<i>E. faecalis</i>			<i>E. faecium</i>				<i>P.</i> <i>damnosus</i> 4797	<i>L.</i> <i>lactis</i> BB24	<i>Y.</i> <i>ruckeri</i> 3276	<i>A.</i> <i>salmonicida</i> 3276	<i>C.</i> <i>jejuni</i> 33560
<i>E. faecalis</i>															
AS10	-	-	-	-	-	-	-	9.7	-	-	7.2	-	-	-	-
M1M32	-	-	-	-	-	-	-	7.4	-	-	8.9	-	-	-	-
M1S19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.2	-	-	-	-
M1S20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.9	-	-	-	-
M2M6	9.2	14.1	11.5	-	-	-	9.6	11.1	12.0	-	16.8	-	-	-	-
M2M39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.2	-	-	-	-
M3M42	9.4	13.6	10.0	-	-	-	8.6	8.3	12.6	-	10.3	-	-	-	-
M3S1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.7	-	-	-	-
PM2-13	-	-	-	-	-	-	-	8.5	-	-	12.2	-	-	-	-

<sup>a</sup>Antimicrobial activity determined by ADT. Results as the diameter of the inhibition halos in millimeters (mm). (-) Antimicrobial activity not detected. Most of the data are means from two independent determinations in triplicate.

<sup>b</sup>Source of indicator microorganisms indicated in Table 1.



### III. BACTERIOCIINOGENIC LAB FROM GRIFFON VULTURES

**Table 3.** Antimicrobial activity<sup>a</sup> of supernatants from isolated *E. faecium* and other lactic acid bacteria (LAB)

Isolate	Indicator microorganism <sup>b</sup>															
	<i>E. faecalis</i>				<i>E. faecium</i>				<i>E. hirae</i>	<i>L. lactis</i>	<i>L. sakei</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>P. damnosus</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>C. jejuni</i>
	DBH18	INIA4	JH2-2	V583	L50	M3K31	P13	T136	910	BB24	2714	910	4032	4797	FBB61	33560
<i>E. faecium</i>																
AS 41	11.5	7.6	11.7	12.8	15.2	12.7	13.4	-	13.6	-	17.9	12.1	13.4	20.4	-	-
BS15	12.2	7.3	11.3	14.6	14.2	14.4	14.0	-	14.0	-	18.9	12.7	13.5	21.3	9.3	-
CS14	11.5	7.1	12.4	12.6	16.9	14.6	15.0	-	14.2	-	18.8	12.1	12.4	22.9	8.6	-
CS46	11.7	8.6	13.5	13.6	16.8	16.9	14.4	-	14.5	-	19.2	11.6	12.5	23.0	8.7	-
M1M10	10.0	-	11.3	13.0	15.1	13.0	14.8	-	14.3	-	15.2	12.4	12.3	21.0	-	-
M1M26	9.4	-	11.8	13.3	15.5	12.6	14.1	-	14.6	-	15.2	11.8	11.6	20.9	-	-
M2M33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.2	-	-	12.2	-	-
M2S31	9.4	-	11.1	11.5	14.2	13.8	14.4	-	-	-	14.5	11.3	12.4	16.8	-	-
M3M31	11.0	7.0	11.8	13.9	16.4	14.6	14.9	-	14.1	-	15.8	12.3	13.2	20.9	9.7	-
M3M32	11.6	8.8	12.8	14.9	16.1	17.9	16.0	-	15.1	-	8.4	11.9	13.0	22.9	10.3	-
M3K31	16.3	15.5	14.3	16.4	16.9	-	18.7	17.8	16.8	18.2	18.0	15.3	17.0	26.4	19.2	-
M4M2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10.1	-	-
PM1-27	11.2	-	10.7	14.0	13.9	12.7	15.8	-	-	-	19.0	11.1	13.6	17.2	-	-
PM1-32	13.0	7.5	11.7	15.5	15.0	12.9	15.5	-	-	-	18.3	11.7	13.9	17.3	10.3	-
PM1-36	12.2	-	11.8	14.5	13.9	12.1	14.5	-	-	-	18.9	12.5	13.8	17.6	9.1	-
PM1-47	13.1	7.8	12.4	14.0	15.6	13.5	15.2	-	-	-	18.5	11.6	12.9	19.5	9.6	-
<i>E. hirae</i>																
M4S3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. mundtii</i>																
M2M33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.2	-	-	12.2	-	-
<i>L. brevis</i>																
PM1-26	11.1	-	10.0	14.6	15.1	12.5	14.0	-	-	-	17.0	11.1	12.6	16.0	-	-

<sup>a</sup>Antimicrobial activity determined by ADT. Results as the diameter of the inhibition halos in millimeters (mm). (-) Antimicrobial activity not detected. Most of the data are means from two independent determinations in triplicate.

<sup>b</sup>Source of indicator microorganisms indicated in Table 1.

**Table 4.** Antimicrobial activity<sup>a</sup> of supernatants from selected LAB against *Listeria* spp.<sup>b</sup>

Strain	<i>L. grayii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. monocytogenes</i>					
	931	910	913	917	917	911	935	936	939	4031	4032
<i>E. faecalis</i>											
M2M6	0.50	0.06	0.05	0.12	0.06	0.06	0.05	0.06	0.06	0.06	0.06
M3M42	0.49	0.06	0.05	0.12	0.06	0.06	0.06	0.06	0.11	0.57	0.06
PM2-13	0.10	0.13	1.05	0.29	0.27	0.22	0.15	0.29	0.15	0.15	0.27
<i>E. faecium</i>											
M1M10	9.1	2.6	16.3	2.2	4.3	34.5	8.5	18.6	3.9	3.5	16.3
M3M31	3.6	3.8	97.9	8.3	19.8	4.1	7.9	18.3	8.2	5.1	12.5
M3M32	3.8	1.9	288.4	35.0	20.1	7.7	7.8	34.9	14.6	4.2	34.7
M3K31	27.6	30.7	1.1x10 <sup>6</sup>	3.0x10 <sup>5</sup>	1.7x10 <sup>3</sup>	12.2	1.1x10 <sup>3</sup>	6.0x10 <sup>3</sup>	3.9x10 <sup>4</sup>	1.7x10 <sup>6</sup>	8.6x10 <sup>6</sup>
PM1-27	1.9	2.3	9.3	7.5	3.7	4.8	3.8	8.7	4.4	1.9	8.4
<i>E. mundtii</i>											
M2M33	NA	0.24	0.23	0.17	0.19	0.17	8.74	0.07	0.08	0.08	0.16
<i>L. brevis</i>											
PM1-26	3.8	1.9	29.1	4.4	4.7	5.0	3.8	9.4	4.4	1.8	8.6

<sup>a</sup>Antimicrobial activity measured by MPA and expressed as 10<sup>3</sup>xBU/mL. NA, No antimicrobial activity detected. Most of the data are means from two independent determinations in triplicate.

<sup>b</sup>All *Listeria* strains belong to the Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Valencia, Spain.

**Table 5.** PCR amplification of bacteriocin structural genes from selected bacteriocinogenic lactic acid bacteria (LAB) isolates

Isolate	<i>aviA</i>	<i>bac3I</i>	<i>bacMC4</i>	<i>breB</i>	<i>ent96</i>	<i>ent1071A-ent1071B</i>	<i>entA</i>	<i>entAS-48</i>	<i>entB</i>	<i>entIT</i>	<i>entISA-entISB</i>	<i>entK4</i>	<i>entL50A-entL50B</i>	<i>entP</i>	<i>entQ</i>	<i>entV583</i>	<i>entXA-entXB</i>	<i>entA</i>	<i>hirJM79</i>	<i>munL</i>	<i>pedA-1</i>
<i>E. faecalis</i>																					
AS10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
M1M32	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
M1S19	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
M1S20	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
M2M6	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
M2M39	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
M3M42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
M3S1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
PM1-27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
PM2-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>E. faecium</i>																					
AS41	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
BS15	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CS14	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CS46	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
M1M10	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
M1M26	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
M2S31	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2M31	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
M3M32	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
M3K31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
M4M2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PM1-27	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PM1-36	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
PM1-37	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PM1-47	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. hirae</i>																					
M4S3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. mundtii</i>																					
M2M33	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. brevis</i>																					
PM1-26	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Table 6.** PCR amplification of genes related to potential virulence in *E. faecalis*

Isolate	Virulence determinants										
	<i>ace</i>	<i>agg</i>	<i>cylA</i>	<i>cylB</i>	<i>cylL<sub>L</sub></i> - <i>cylL<sub>S</sub></i>	<i>cylM</i>	<i>efaAfm</i>	<i>efaAfs</i>	<i>esp</i>	<i>gelE</i>	<i>sprE</i>
<i>E. faecalis</i>											
AS10	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
M1M32	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
M1S19	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
M1S20	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
M2M6	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
M2M39	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
M3M42	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
M3S1	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
PM2-13	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+

**Table 7.** Antimicrobial activity<sup>a</sup> of chromatographically purified enterocin HF and enterocin A produced by *E. faecium* M3K31 and *E. faecium* T136, respectively, against *Listeria* spp. and *P. damnosus* CECT4797<sup>b</sup>

Purified bacteriocins	<i>L. grayii</i> 913	<i>L. innocua</i> 910	<i>L. ivanovii</i> 913	<i>L. seeligeri</i> 917	<i>L. welshimeri</i> 917	<i>L. monocytogenes</i>						<i>P. damnosus</i> 4797
						911	935	936	939	4031	4032	
Enterocin HF	1,168	4	8.3x10 <sup>9</sup>	582	464	9	364	1,118	155	55	2,455	73
Enterocin A	8	9	19,000	10	5	10	17	8	10	2	14	5

Most of the data are means from two independent determinations in triplicate.

<sup>a</sup> Antimicrobial activity measured by MPA and expressed as BU/ng of purified bacteriocin.

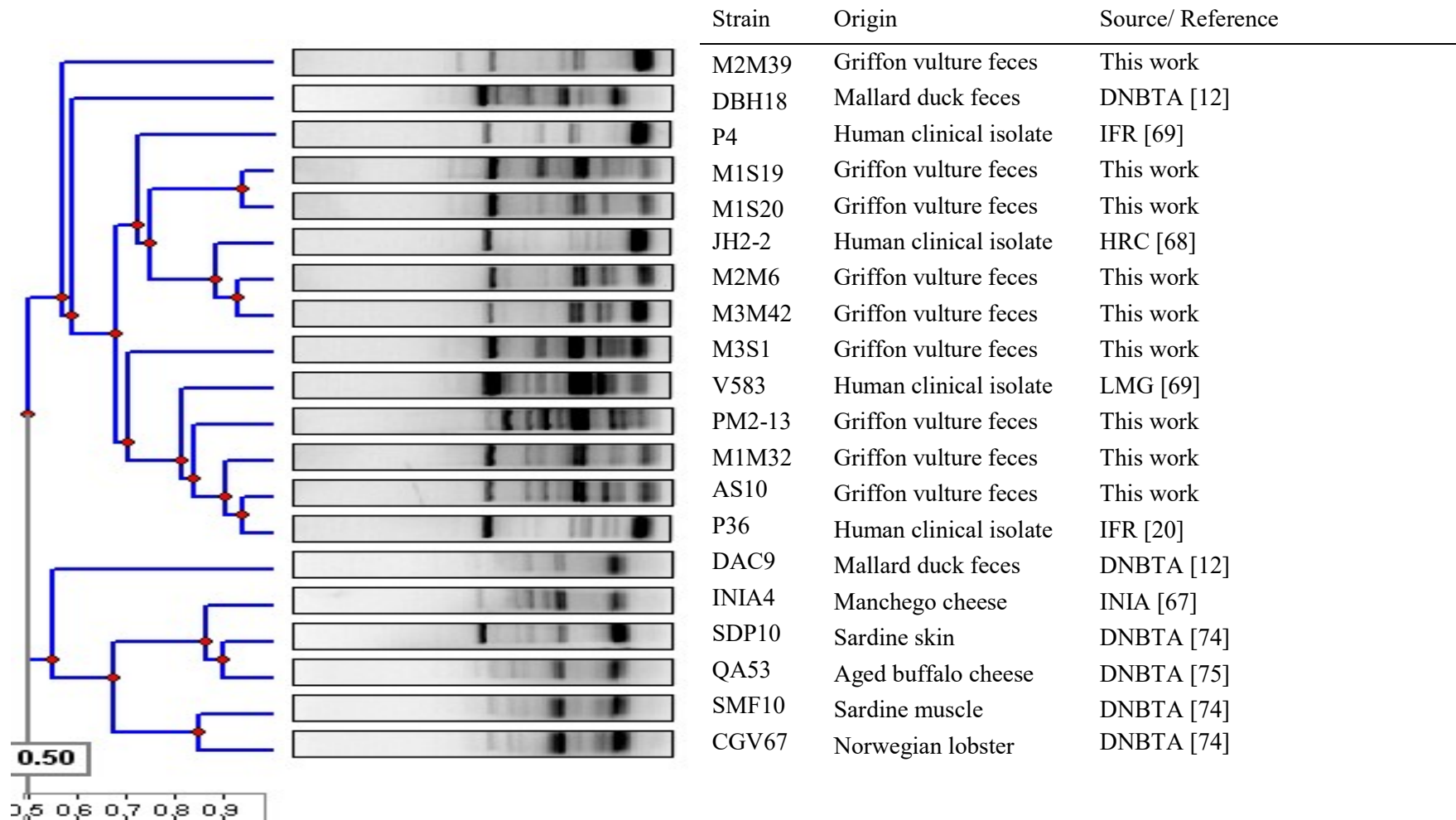
<sup>b</sup> All *Listeria* spp. strains and *P. damnosus* 4797 were obtained from the Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Valencia, Spain.

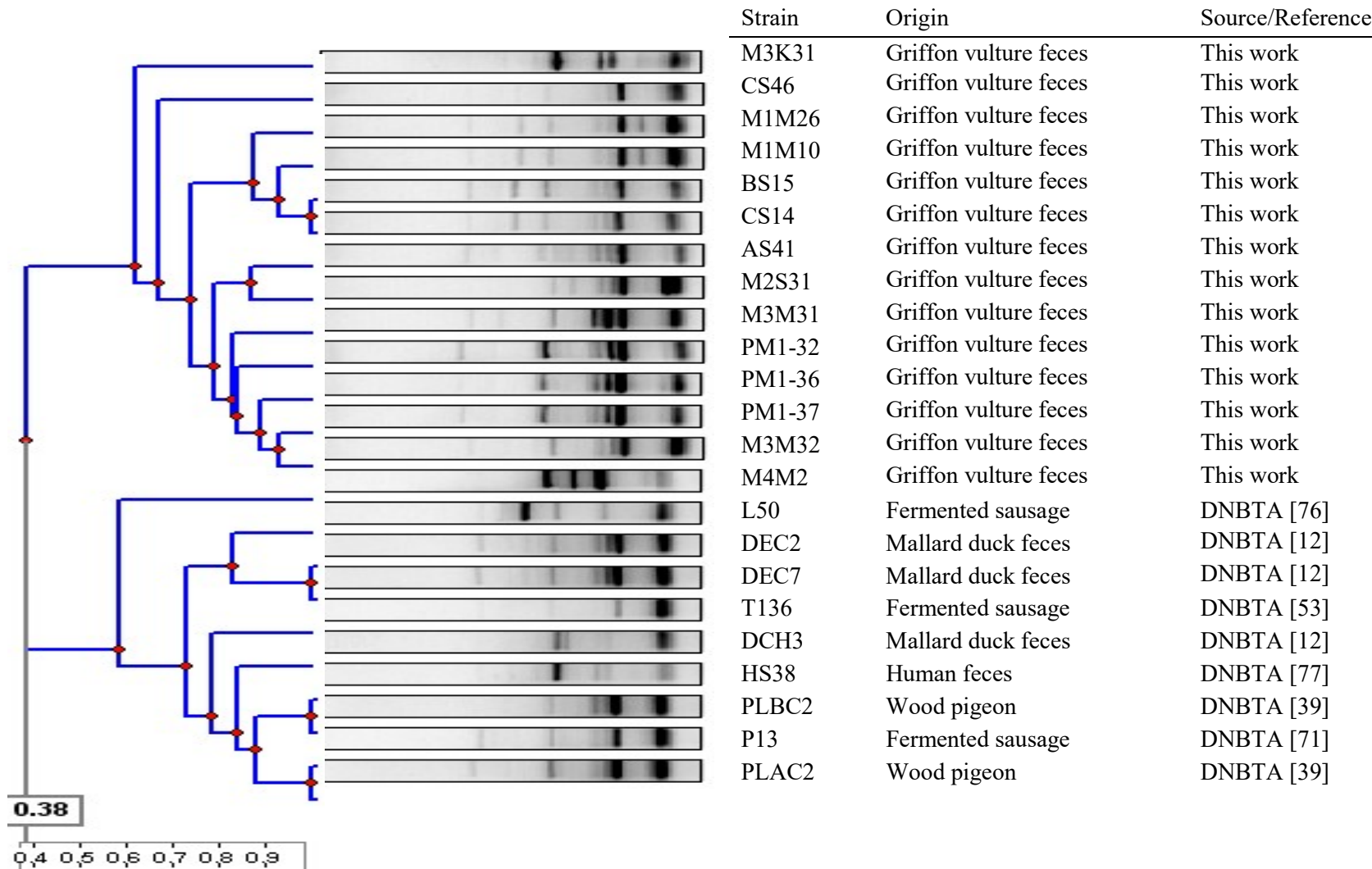
### Legend to figures

**Figure 1.** Dendrogram of ERIC-PCR showing the relatedness amongst the *E. faecalis* (A) and *E. faecium* (B) isolates from griffon vulture feces and enterococcal isolates from other food, environmental and clinical origin.

**Figure 2.** MALDI-TOF MS analysis of purified bacteriocins from *E. faecium* M1M10 (A) and *E. faecium* M3K31 (B). MALDI TOF/TOF tandem MS analysis of the purified bacteriocin from *E. faecium* M3K31 (C). The carboxy-terminal (y-ion series) shows the 27-residue peptide SVDWGKAIGIIGNNAAANLTTGGKAGW (top line) and the amino-terminal (b-series) shows the 14-residue peptide AAANLTTGGKAGWK (bottom line). Numbers indicate molecular mass in daltons.

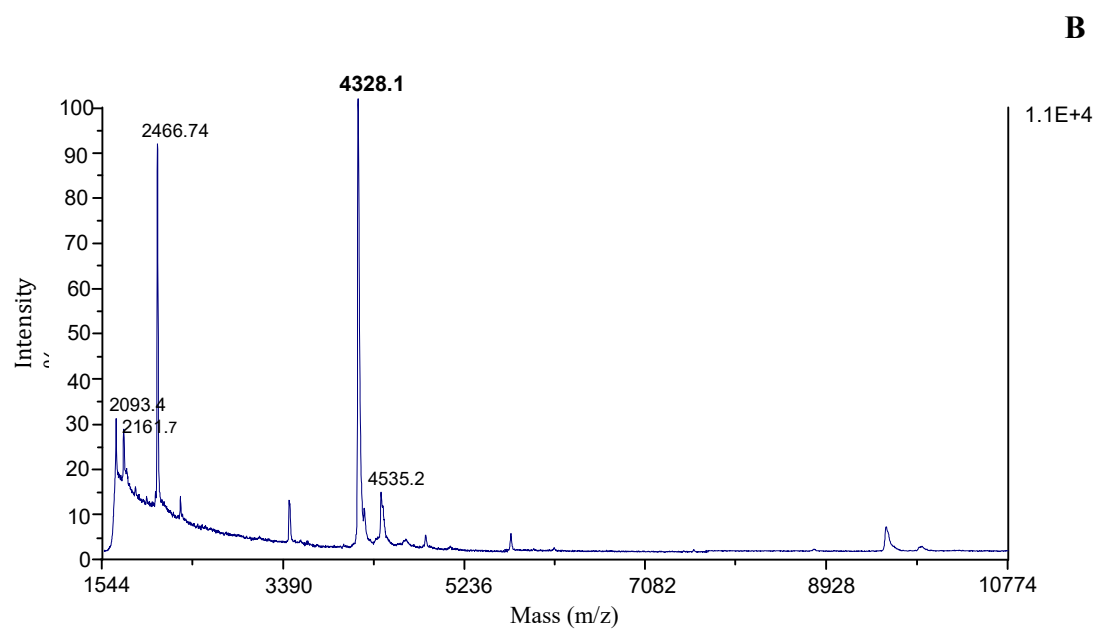
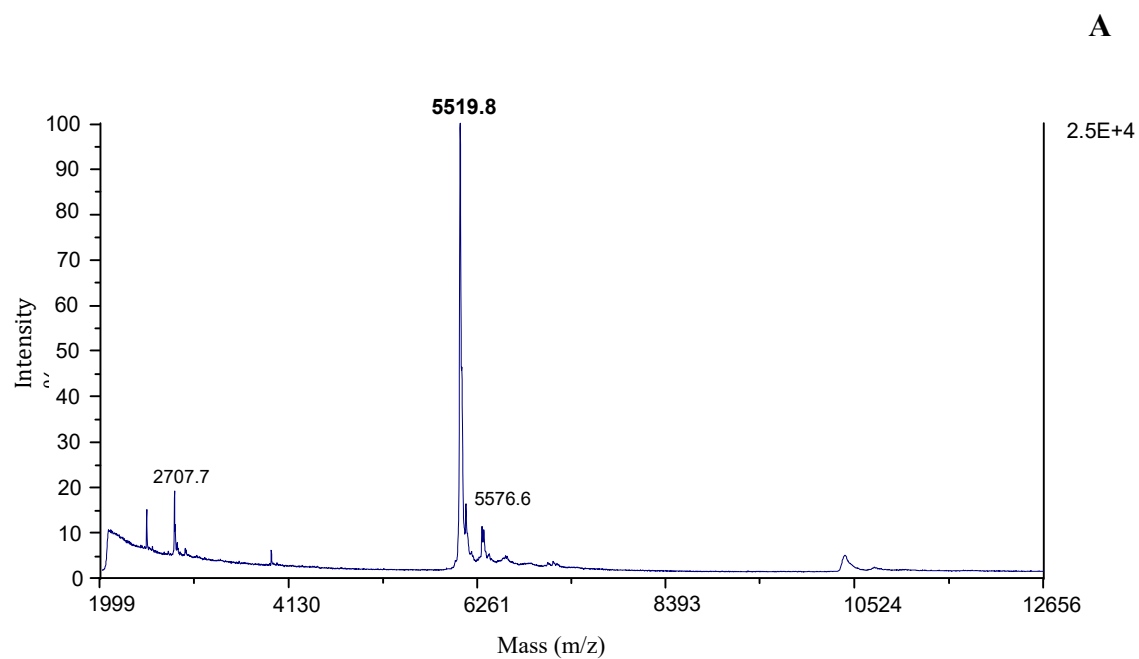
**Figure 1 (A)**

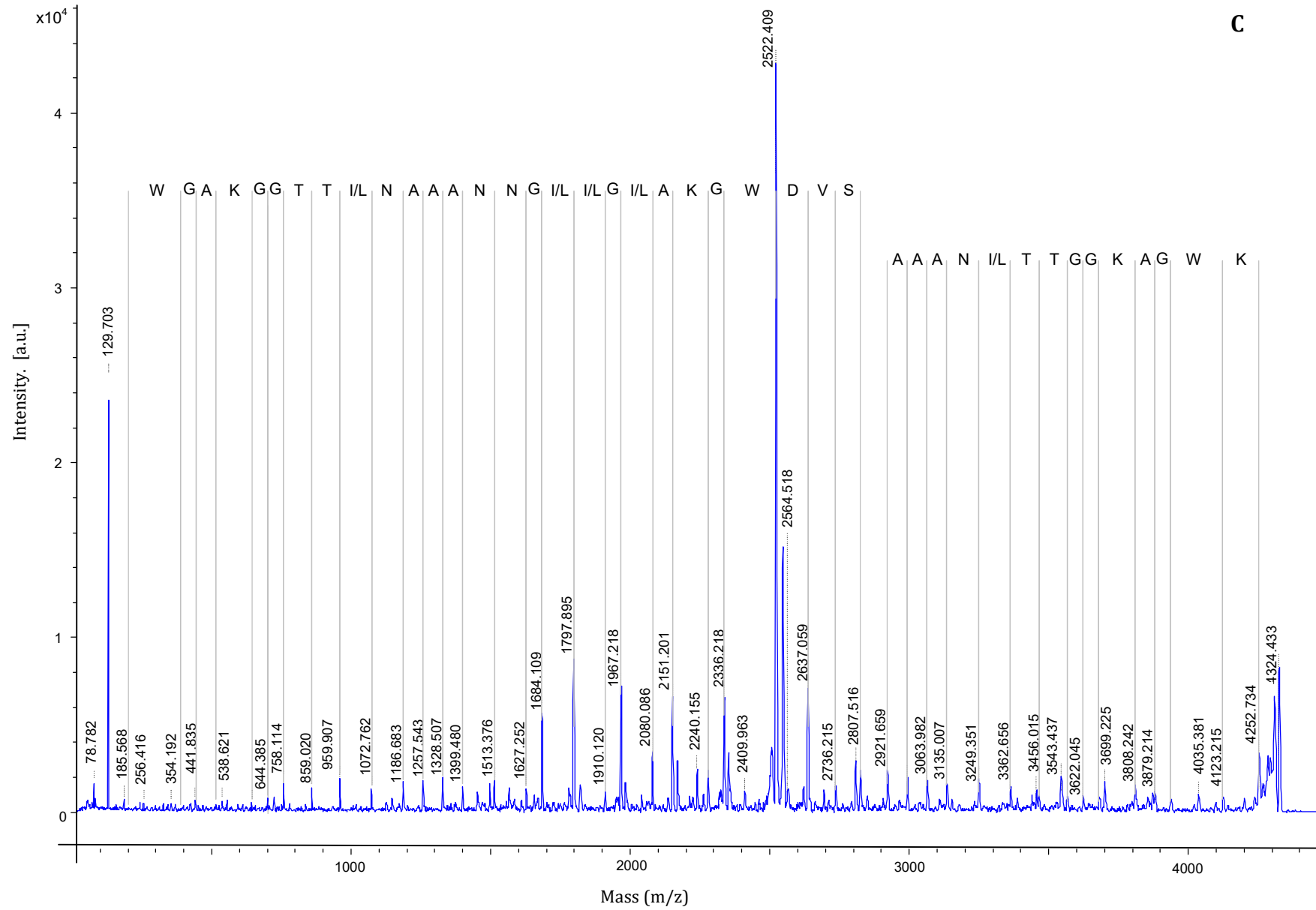


**Figure 1 (B)**



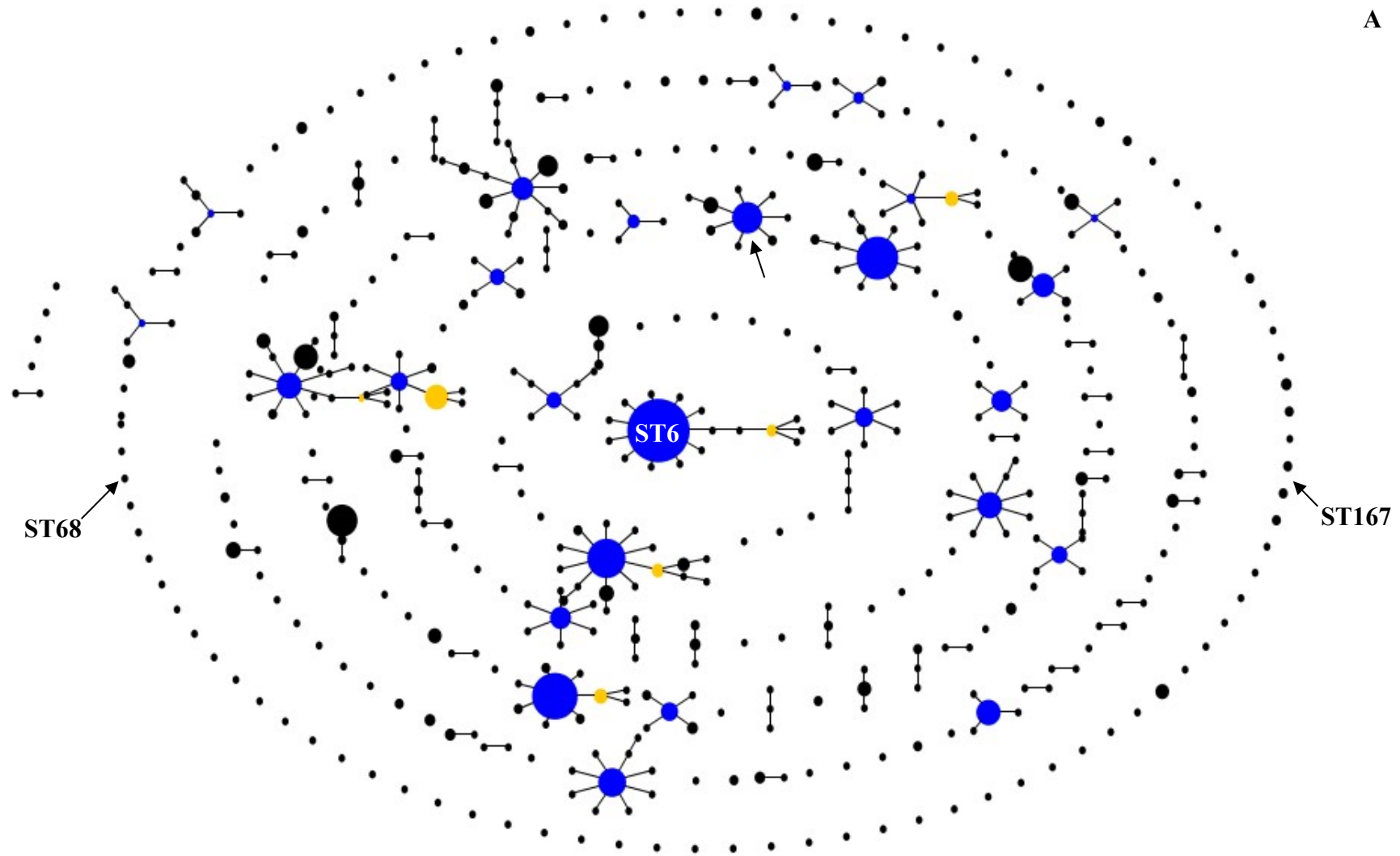
**Figure 2**



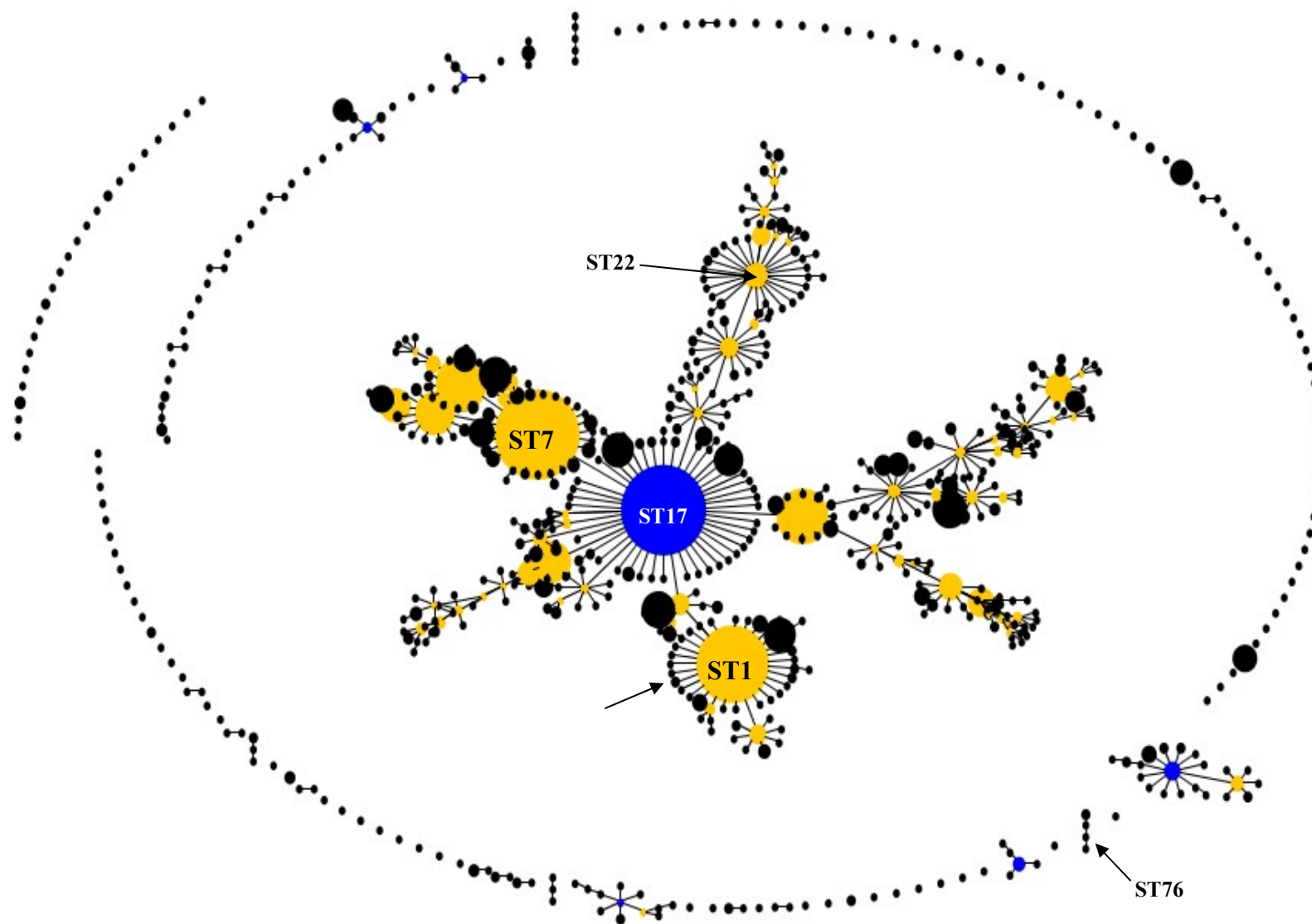


### Legend to Figures (Supplementary)

**Figure 1S.** Comparative eBURST analysis against whole MLST from *E. faecalis* (A) and *E. faecium* (B). The indicated ST sequences belong to hospital-adapted clonal complexes (CC). In Figure 1A, ST6 belongs to clonal complex 2 (CC2) and ST9 to CC9. In Figure 1B, the ST17, ST18 and ST78 belong to CC17, CC18 and CC78, respectively.



B



**Table 1S.** Primers and PCR conditions for bacteriocin amplification used in this study

Bacteriocin (Reference)/Target gene	Primer	Nucleotide sequence (5'-3')	Annealing T (°C)	PCR positive control (Reference)	PCR product length (bp)	Primer reference
Avicin A [1]/ <i>aviF</i>	AVI-F AVI-R	GTTGTTGGTGGTACCTACTATGG GTAGACATGAACCTACCACC	53°C	Not available	191	This work
Bacteriocin 31 [2]/ <i>bac31</i>	SB31-F SB31-R	TTGTGGCATTATTGGGATTG GCCATGTTGTACCCAACCA	56°C	Not available	166	This work
Bacteriocin MC4-1 [3]/ <i>bacA</i>	MC4-F MC4-R	CGGGATTGGTTTTACAGCAT ATGCTGTAAAACCAATCCCG	57°C	Not available	135	This work
Brevicin 925A [4]/ <i>breB</i>	BREV-F BREV-R	CAGTTGATGAATTAGCATTGATTG AGTGCATGCCGTGTAAGTTG	56°C	Not available	192	This work
Enterocin 96 [5]/ <i>ent96</i>	S96-F S96-R	ATTAGAAAATGGTGTAGTAAATGCTG TCATTACAACCAGCTGGATCAC	56°C	Not available	183	This work
Enterocin 1071 [6]/ <i>ent1071</i>	S171-F S1071-R	TAGGTCCAGCTGCTTATTGG CAGGTCCCTCCACCAGTAATTG	56°C	<i>E. faecalis</i> FAIR-E309 [6]	199	This work
Enterocin A [7]/ <i>entA</i>	EnterA-F EnterA-R	ATGAAACATTTAAAAATTTTGTCTATTAAAG TTAGCACTTCCCTGGAATTGCTCC	59°C	<i>E. faecium</i> T136 [8]	197	[9]
Enterocin AS-48 [10]/ <i>entAS-48</i>	SAS48-F SAS48-R	TTTGGGGTTAGCCTTGTTTA TGCTGCAGCGAGTAAAGAAA	56°C	<i>E. faecalis</i> INIA-4 [11]	191	This work
Enterocin B [8]/ <i>entB</i>	EntB3 EntB5	AGACCTAACAACCTTATCTAAAG GTTGCATTTAGAGTATACATTTGC	50°C	<i>E. faecium</i> T136 [8]	126	[8]
Enterocin IT [12]/ <i>entIT</i>	SIT-F SIT-R	TGGTAGCTAGTTTGTGTTTGTTTAGC GCAGTCCAACCTCATAAGGTAACA	56°C	Not available	213	This work
Enterocin JS (EF502034)/ <i>ent JS</i>	EntJSA-F EntJSA-R	ATGGGAGCAATTGCAAAAATTAGTAGC TCAATGTCTTTTAAACCATTTTCAATTTGATC	58°C	<i>E. faecalis</i> DBH18 [13]	310	This work
Enterocin SE-K4 [14]/ <i>entSE</i>	SEK4-FW SEK4-RV	GCCACGTATTACGGAAATGGTGTC TTATCTTCCACCTATACCACCTAACAC	53°C	<i>E. faecalis</i> FAIR-E309 [6]	146	[6]
Enterocin L50 [15]/ <i>entL50</i>	EntL50-R1 EntL50-R2	ATGGGAGCAATCGCAAAAATTAGTAGC TTAATGTCTTTTATGCCATTTTCAAT	65°C	<i>E. faecium</i> L50 [15]	286	[18]

---

### III. BACTERIOCINOGENIC LAB FROM GRIFFON VULTURES

---

Enterocin P [16]/ <i>entP</i>	EntP1 EntP2	ATGAGAAAAAAATTATTTAGTTTAGCTCTTATTGG TTAATGTCCCATACCTGCCAAACCAG	64°C	<i>E. faecium</i> P13 [16]	216	[16]
Enterocin Q [17]/ <i>entQ</i>	EntQ-R1 EntQ-R2:	ATGAATTTTCTTAAAAATGGTATCGCAAAATG TTAACAAGAAATTTTTCCCATGGCAAG	57°C	<i>E. faecium</i> L50 [17]	105	[18]
Enterococcin V583 [19]/ <i>ef1097</i>	EF1097-F3 EF1097-R3	GGCGATGGCATTACTAATGACATTAGG CTTAGCCCACATTGAACTGCCCATAAAGC	65°C	<i>E. faecalis</i> DBC5 [13]	408	[9]
Enterocin X [20]/ <i>entXA-XB</i>	SXAB- F SXAB-R	TGAAACAAATTATCGGTGGTTC CTACGTCCACCATTCCAACC	56°C	Not available	322	This work
Enterolysin A [21]/ <i>enlA</i>	SENLA-F SENLA-R	GGGTTTGACTTTGGTTCTGC TTTTGGTCCTGGATTGGAG	56°C	<i>E. faecalis</i> DBH9 [13]	378	This work
Hiracin JM79 [13]/ <i>hirJM79</i>	SHIR-F SHIR-R	AGGAATATTAGGAACTTGTCTAGCTG GGACCATGATTAACCCAACC	56°C	<i>E. hirae</i> DCH5 [13]	171	This work
Mundticin L [22]/ <i>munL</i>	SML-F SML-R	TGGGAAATACTACGGTAATGG ACCAGCTGCTCCACCAGTAG	56°C	Not available	124	This work
Pediocin PA-1 [23]/ <i>pedA-1</i>	PA1-F PA1-R	GAAATGGCCAATATCATTGGTG CTAGCATTTATGATTACCTTGATGTC	58°C	<i>P. acidilactici</i> 347 [24]	158	This work

---

## References for Table S1

1. Birri DJ, Brede DA, Forberg T, Holo H, Nes IF. Molecular and genetic characterization of a novel bacteriocin locus in *Enterococcus avium* isolates from infants. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010;76:483–92.
2. Tomita H, Fujimoto S, Tanimoto K, Ike Y. Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYI17. *J. Bacteriol.* 1996;178:3585–93.
3. Sedgley CM, Clewell DB, Flannagan SE. Plasmid pAMS1-encoded, bacteriocin-related “siblicide” in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 2009;191:3183–8.
4. Wada T, Noda M, Kashiwabara F, Jeon HJ, Shirakawa A, Yabu H, et al. Characterization of four plasmids harboured in a *Lactobacillus brevis* strain encoding a novel bacteriocin, brevicin 925A, and construction of a shuttle vector for lactic acid bacteria and *Escherichia coli*. *Microbiology* 2009;155:1726–37.
5. Izquierdo E, Wagner C, Marchioni E, Aoude-Werner D, Ennahar S. Enterocin 96, a novel Class II bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* WHE 96, isolated from munster cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009;75:4273–6.
6. Franz CMAP, Grube A, Herrmann A, Abriouel H, Stärke J, Lombardi A, et al. Biochemical and genetic characterization of the two-peptide bacteriocin enterocin 1071 produced by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 309. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002;68:2550–4.
7. Aymerich T, Holo H, Håvarstein LS, Hugas M, Garriga M, Nes IF. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996;62:1676–82.
8. Casaus P, Nilsen T, Cintas LM, Nes IF, Hernández PE, Holo H. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 1997;143:2287–94.
9. Brandão A, Almeida T, Muñoz-Atienza E, Torres C, Igrejas G, Hernández PE, et al. Antimicrobial activity and occurrence of bacteriocin structural genes in *Enterococcus* spp. of human and animal origin isolated in Portugal. *Arch. Microbiol.* 2010;192:927–36.
10. Gálvez A, Maqueda M, Valdivia E, Quesada A, Montoya E. Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. *Can. J. Microbiol.* 1986;32:765–71.
11. Joosten HM, Nunez M, Devreese B, Van Beeumen J, Marugg JD. Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA 4. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996;62:4220–3.
12. Izquierdo E, Cai Y, Marchioni E, Ennahar S. Genetic identification of the bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* IT62 and evidence that bacteriocin 32 is identical to enterocin IT. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009;53:1907–11.
13. Sánchez J, Basanta A, Gómez-Sala B, Herranz C, Cintas LM, Hernández PE. Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int. J. Food Microbiol.* 2007;117:295–305.
14. Eguchi T, Kaminaka K, Shima J, Kawamoto S, Mori K, Choi SH, et al. Isolation and characterization of enterocin SE-K4 produced by thermophilic enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2001;65:247–53.
15. Cintas LM, Casaus P, Holo H, Hernandez PE, Nes IF, Håvarstein LS. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* 1998;180:1988–94.



16. Cintas LM, Casaus P, Håvarstein LS, Hernández PE, Nes IF. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997;63:4321–30.
17. Cintas LM, Casaus P, Herranz C, Håvarstein LS, Holo H, Hernández PE, et al. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* 2000;182:6806–14.
18. Citti, R. (2005). Aislamiento e identificación de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de leches y quesos de búfala de Venezuela: actividad antimicrobiana y caracterización bioquímica y genética de sus bacteriocinas. PhD. Thesis. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, Spain.
19. Swe PM, Heng NCK, Ting Y-T, Baird HJ, Carne A, Tauch A, et al. *efl097* and *ypkK* encode enterococcin V583 and corynicin JK, members of a new family of antimicrobial proteins (bacteriocins) with modular structure from Gram-positive bacteria. *Microbiology* 2007;153:3218–27.
20. Hu C-B, Malaphan W, Zendo T, Nakayama J, Sonomoto K. Enterocin X, a novel two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecium* KU-B5, has an antibacterial spectrum entirely different from those of its component peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010;76:4542–5.
21. Nilsen T, Nes IF, Holo H. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003;69:2975–84.
22. Feng G, Guron GKP, Churey JJ, Worobo RW. Characterization of mundticin L, a class IIa anti-*Listeria* bacteriocin from *Enterococcus mundtii* CUGF08. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009;75:5708–13.
23. Henderson JT, Chopko AL, van Wassenaar PD. Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Arch. Biochem. Biophys.* 1992;295:5–12.
24. Martínez JM, Martínez MI, Suárez AM, Herranz C, Casaus P, Cintas LM, et al. Generation of polyclonal antibodies of predetermined specificity against pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998;64:4536–45.

# CAPÍTULO *CHAPTER*

## IV

**CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES SINTÉTICOS QUE  
CODIFICAN LAS BACTERIOCINAS DE AMPLIO  
ESPECTRO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA SRCAM  
602, OR-7, E-769 Y L-1077, POR *Pichia pastoris***

---

***CLONING AND EXPRESSION OF SYNTHETIC GENES  
ENCODING THE BROAD ANTIMICROBIAL SPECTRUM  
BACTERIOCINS SRCAM 602, OR-7, E-760, and L-1077, BY  
RECOMBINANT *Pichia pastoris****



## Research Article

# Cloning and Expression of Synthetic Genes Encoding the Broad Antimicrobial Spectrum Bacteriocins SRCAM 602, OR-7, E-760, and L-1077, by Recombinant *Pichia pastoris*

**Sara Arbulu, Juan J. Jiménez, Loreto Gútiérrez, Luis M. Cintas, Carmen Herranz, and Pablo E. Hernández**

*Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Avenida Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Spain*

Correspondence should be addressed to Pablo E. Hernández; ehernan@vet.ucm.es

Received 30 July 2014; Accepted 2 November 2014

Academic Editor: J. Eleazar Barboza-Corona

Copyright © 2015 Sara Arbulu et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

We have evaluated the cloning and functional expression of previously described broad antimicrobial spectrum bacteriocins SRCAM 602, OR-7, E-760, and L-1077, by recombinant *Pichia pastoris*. Synthetic genes, matching the codon usage of *P. pastoris*, were designed from the known mature amino acid sequence of these bacteriocins and cloned into the protein expression vector pPICZαA. The recombinant derived plasmids were linearized and transformed into competent *P. pastoris* X-33, and the presence of integrated plasmids into the transformed cells was confirmed by PCR and sequencing of the inserts. The antimicrobial activity, expected in supernatants of the recombinant *P. pastoris* producers, was purified using a multistep chromatographic procedure including ammonium sulfate precipitation, desalting by gel filtration, cation exchange-, hydrophobic interaction-, and reverse phase-chromatography (RP-FPLC). However, a measurable antimicrobial activity was only detected after the hydrophobic interaction and RP-FPLC steps of the purified supernatants. MALDI-TOF MS analysis of the antimicrobial fractions eluted from RP-FPLC revealed the existence of peptide fragments of lower and higher molecular mass than expected. MALDI-TOF/TOF MS analysis of selected peptides from eluted RP-FPLC samples with antimicrobial activity indicated the presence of peptide fragments not related to the amino acid sequence of the cloned bacteriocins.

## 1. Introduction

The antimicrobial peptides (AMPs) are broad spectrum small molecular weight compounds with antagonistic activity against bacteria, viruses, and fungi. Among them, bacteriocins form a widely studied and well-characterized group of ribosomally synthesized peptides produced by bacteria, and those produced by lactic acid bacteria (LAB) attract considerable interest primarily as natural food preservatives but also with great interest in exploring their application as therapeutic antimicrobial agents [1–3]. Most LAB bacteriocins are synthesized as biologically inactive precursors or prepropeptides containing an N-terminal extension that is cleaved off during export to generate their biologically active or mature form. The mature peptides are often cationic, amphiphilic molecules that are generally classified into two

main classes: the lantibiotics or class I bacteriocins that consist of modified bacteriocins and the class II or nonmodified bacteriocins [4, 5]. The class II bacteriocins have been further divided into several subgroups, from which the class IIa or pediocin-like bacteriocins show a strong antilisterial activity and the N-terminal consensus sequence YGNGV(X)C [5].

Considering the low amount of AMPs obtained from their direct purification from natural producers and the elevated production costs of chemical synthesis, the biological production of bacteriocins by heterologous microbial hosts may provide an opportunity for their production in large amounts and with higher specific antimicrobial activity [6–8]. Furthermore, the production of bacteriocins by yeasts may have some advantages over bacterial cells regarding specific posttranscriptional and posttranslational modifications [9]. Yeasts are also cost-effective producers with large

production and high yields of the desired protein [10]. *Pichia pastoris* (currently reclassified as *Komagataella pastoris*) is being used as heterologous producer of bacteriocins because of its ability to produce large amounts of properly folded and biologically active bacteriocins [8, 11, 12]. *P. pastoris* also produces disulfide-bonded and glycosylated proteins, which are crucial features for functionality [13]. The use of synthetic genes may also constitute a successful approach for heterologous production and functional expression of bacteriocins by recombinant yeasts when the DNA sequence encoding the bacteriocin is not available or difficult to obtain [12]. Furthermore, the use of synthetic genes matching the codon usage of the host microorganism can have a significant impact on gene expression levels and protein folding [14].

Several bacteriocins with broad antimicrobial spectrum have been identified from chicken commensal bacteria including bacteriocin SRCAM 602 produced by *Paenibacillus polymyxa* [15, 16], bacteriocins OR-7 and L-1077 produced by *Lactobacillus salivarius* [17, 18], and bacteriocins E-760 and E 50-52 produced by *Enterococcus* spp. [19, 20]. All these bacteriocins have been reported to be active against Gram-positive and Gram-negative bacteria including *Campylobacter* spp., reducing *Campylobacter* colonization in poultry and considered potentially useful towards on-farm control of this foodborne human pathogen [21]. Most animal studies suggest that these bacteriocins considerably reduce *C. jejuni* colonization in chicken intestine and thus may reduce *Campylobacter* spp. infections in humans [17, 19, 20]. However, to our knowledge, none of the genes encoding these bacteriocins have been sequenced so far. Accordingly, in this study we report the use of synthetic genes designed from the published amino acid sequence of the mature bacteriocins SRCAM 602, OR-7, E-760, and L-1077 and with adapted codon usage for expression by *P. pastoris*, their cloning into the protein expression vector pPICZαA, and their expression by recombinant *P. pastoris* X-33.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Microbial Strains and Plasmids.** Microbial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *Enterococcus faecium* T136 and *Pediococcus damnosus* CECT4797 were grown in MRS broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) at 32°C. *P. pastoris* X-33 (Invitrogen S.A., Barcelona, Spain) was cultured in YPD medium (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) at 30°C with shaking (200–250 rpm). *Escherichia coli* JM109 (Promega, WI, USA) was grown in LB broth (Sigma-Aldrich) at 37°C with shaking (250 rpm). *Listeria monocytogenes* CECT4032 was grown in LB at 37°C and *Salmonella typhimurium* CECT443 was grown in TSB (Oxoid) at 37°C. *Campylobacter jejuni* ATCC33560 and *C. jejuni* NCTC11168 were grown in BHI supplemented with 1% defibrinated horse serum (BD Bioscience, CA, USA) at 37°C in microaerophilic conditions. *E. coli* O157:H7 was grown in LB at 37°C with shaking (250 rpm). *Yersinia ruckeri* LMG3279 was grown in TSB at 28°C. Zeocin (Invitrogen) was added when needed at concentrations of 25, 100, or 1000 µg/mL. Strains cited as CECT belong to the Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, Spain), ATCC to the American Type Culture

Collection (Rockville, MD, USA), and NCTC to the National Collection of Type Cultures (London, UK).

**2.2. Basic Genetic Techniques and Enzymes.** The published amino acid sequences of mature bacteriocins SRCAM 602, OR-7, E-760, and L-1077 were used as templates to design the nucleotide sequence of the synthetic genes *srcam602*, *or-7*, *e-760*, and *l-1077* matching the codon usage of *P. pastoris* X-33. These synthetic genes contained a 5'-nucleotide appendix including a *XhoI* restriction site and a 3'-nucleotide appendix including the termination of translation codon (TAA) and the *NotI* restriction site. All synthetic genes were supplied by GeneArt (Life Technologies, Paisley, UK). DNA restriction enzymes were supplied by New England BioLabs (Ipswich, MA, USA). Ligations were performed with the T4 DNA ligase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). *E. coli* JM109 cells were transformed as described by the supplier. Competent *P. pastoris* X-33 cells were obtained as recommended by the supplier and electroporation of competent cells was performed as previously described [22]. Electrocompetent cells were transformed with a Gene Pulser and Pulse Controller apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

**2.3. PCR Amplification and Nucleotide Sequencing.** Oligonucleotide primers were obtained from Sigma-Genosys Ltd. (Cambridge, UK). PCR amplifications were performed in 50 µL reaction mixtures containing 1 µL of purified DNA, 70 pmol of each primer, and 1 U of Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) in a DNA thermal cycler Techgene (Techne, Cambridge, UK). The PCR-generated fragments were purified by a NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co., Düren, Germany) for cloning and nucleotide sequencing. Nucleotide sequencing of the purified PCR products was performed using the ABI PRISM BigDye Terminator cycle sequence reaction kit and the automatic DNA sequencer ABI PRISM, model 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), at the Unidad de Genómica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Madrid, Spain.

**2.4. Cloning of the *srcam602*, *or-7*, *e-760*, and *l-1077* Synthetic Genes in *P. pastoris* X-33 and Antimicrobial Activity of the Transformants.** The primers and inserts used for construction of the recombinant plasmids are listed in Table 2. Derivatives of plasmid pPICZαA were constructed as follows: primers S602-F, S071-F, and SARP-R were used for PCR amplification from plasmids pMATSRCAM602, pMATOR-7, pMATE-760, and pMATL-1077 of nucleotide fragments in frame with the *S. cerevisiae* α-factor secretion signal, without the Glu-Ala spacer adjacent to the Kex2 protease cleavage site, fused to the *srcam602*, *or-7*, *e-760*, and *l-1077* synthetic genes. Digestion of the above cited fragments with the *XhoI*-*NotI* restriction enzymes permitted ligation of the resulting R-SRCAM602, R-OR7, R-E760, and R-L1077 nucleotide fragments of 136-, 181-, 242-, and 167-bp, respectively, into pPICZαA digested with the same enzymes to generate the plasmid-derived vectors pSRCAM602, pOR-7, pE-760, and pL-1077, respectively. Competent *E. coli* JM109 cells were used

TABLE I: Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Description <sup>a</sup>	Source and/or reference <sup>b</sup>
<b>Strains</b>		
<i>Enterococcus faecium</i> T136	Enterocin A and B producer; MPA positive control	DNBTA
<i>Pediococcus damnosus</i> CECT4797	MPA indicator microorganism	CECT
<i>Escherichia coli</i> JM109	Selection of recombinant plasmids	Promega
<i>Pichia pastoris</i> X-33	Yeast producer	Invitrogen Life Technologies
<b>Plasmids</b>		
pMA-T	Amp <sup>r</sup> ; carrier of synthetic genes	GeneArt Life Technologies
pPICZαA	Zeo <sup>r</sup> ; integrative plasmid carrying the secretion signal sequence from the <i>S. cerevisiae</i> α-factor prepropeptide and functional sites for integration at the 5' AOX1 locus of <i>P. pastoris</i> X-33	Invitrogen Life Technologies
pMATSRCAM602	Amp <sup>r</sup> ; pMA-T plasmid carrying the <i>srcam602</i> synthetic gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	GeneArt Life Technologies
pMATOR-7	Amp <sup>r</sup> ; pMA-T plasmid carrying the <i>or-7</i> synthetic gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	GeneArt Life Technologies
pMATE-760	Amp <sup>r</sup> ; pMA-T plasmid carrying the <i>e-760</i> synthetic gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	GeneArt Life Technologies
pMATL-1077	Amp <sup>r</sup> ; pMA-T plasmid carrying the <i>l-1077</i> synthetic gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	GeneArt Life Technologies
pSRCAM602	pPICZαA derivative with the <i>srcam602</i> synthetic gene	This work
pOR-7	pPICZαA derivative with the <i>or-7</i> synthetic gene	This work
pE-760	pPICZαA derivative with the <i>e-760</i> synthetic gene	This work
pL-1077	pPICZαA derivative with the <i>l-1077</i> synthetic gene	This work

<sup>a</sup> Amp<sup>r</sup>: ampicillin resistance; Zeo<sup>r</sup>: zeocin resistance.<sup>b</sup> DNBTA: Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (Madrid, Spain); CECT: Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, Spain).

TABLE 2: Primers and PCR products used in this study.

Primers, PCR products, or bacteriocins	Nucleotide sequence (5'-3') or description	Amplifications
<b>Primers</b>		
S602-F	GCCATGAGCTCGAATTCCTGAGAAAAAG	R-SRCAM602, R-E760, R-L1077
S071-F	GTCCAGAGCTCGAATTCCTGAGAAAAAG	R-SRCAM 602, R-E760, R-L1077, R-OR7
SARP-R	AGGTACCATAAGTTGCGGCCGC	pPICZαA amplification fragment including the cloned synthetic gene
ALFA-F	TACTATTGCCAGCATTTGCTGC	pPICZαA amplification fragment including the cloned synthetic gene
<b>3AOXI-R</b>		
<b>PCR products</b>		
R-SRCAM602	GCAAAATGGCAATTCCTGACATCC	
R-OR7	136-bp <i>XhoI</i> / <i>NotI</i> fragment containing the α-factor Kex2 signal cleavage fused to the mature synthetic <i>srcam602</i> gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	
R-E760	181-bp <i>XhoI</i> / <i>NotI</i> fragment containing the α-factor Kex2 signal cleavage fused to the mature synthetic <i>or-7</i> gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	
R-L1077	242-bp <i>XhoI</i> / <i>NotI</i> fragment containing the α-factor Kex2 signal cleavage fused to the mature synthetic <i>e-760</i> gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	
<b>Bacteriocins</b>		
BacSRCAM602 (amino acid sequence)	ATYYNGNGLYCNKQKHYYTWVDWVNKASR EIGKITVNGWVQVH	
BacSRCAM602 ( <i>P. pastoris</i> codon usage)	gctactactacggtaacggctcttactgtatacaagcagaagcaact acactgggttgactggacaaggcttcagagagatcggtaag atcactgttaac-gggtgggtcaaca	
BacOR-7 (amino acid sequence)	KTTYGTNGVHCTKNSLWGKVKRLKNMK YDQNTTTYMGRQLDILLGWATGAFGKTFH	
BacOR-7 ( <i>P. pastoris</i> codon usage)	aagacttactacggaaactaacgggtgtcactgtactaagaattcctt gtgggtaaggtagattgaagaacatgaagtacgacagaaca ctactcaatgggttagattgcaggacatctgtgggtgggctact gggtcttcggtaagacatttcat	
BacE-760 (amino acid sequence)	NRWYCNSAAGGVGGAACVCGLAGYVGE AKENIAGEVRKGWGMAGGFTHNKACKS FPGSGWASG	
BacE-760 ( <i>P. pastoris</i> codon usage)	aacagatgggtactgaactccgtcgtgggtgtgtgggtgct gcgtgttgggttggctgggtatgtgtgtgaggtctaaagaaacat tgctggtaggttagaagggtgggtagtggtgtgtgtttcac tcataacaggcttgaagctctccacaggttcgggtgggtcctgggt TNYGNGVGVDPDAIMAGIILKLIIFINIRQGY NFGKKAT	
BacL-1077 ( <i>P. pastoris</i> codon usage)	actaactacggtaacgggtgtgtgtgttcacagcgtattatggctg gtatcatcaagttgattcttcatctcaacatcagacagggttaacaac ttc-oorfaaaoaoctact	

for cloning and vector propagation and the resulting transformants were confirmed by PCR amplification and sequencing of the inserts. Subsequently, the *SacI*-linearized pSRCAM602, pOR-7, pE-760, and pL-1077 vectors were transformed into competent *P. pastoris* X-33 cells yielding zeocin resistant derivatives on YPD agar supplemented with zeocin (100 and 1,000 µg/mL) and sorbitol (1M). The presence of the integrated synthetic genes in the transformed yeast cells was confirmed by PCR and DNA sequencing of the inserts.

The antimicrobial activity of individual *P. pastoris* X-33SRCAM602, *P. pastoris* X-33OR-7, *P. pastoris* X-33E-760, and *P. pastoris* X-33L-1077 was screened by a streak-on-agar test (SOAT). Briefly, the *P. pastoris* transformants were streaked onto BMMY buffered methanol complex medium (1% yeast, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate (pH 6), 1.34% yeast nitrogen base (YNB) without amino acids,  $4 \times 10^{-5}$  biotin, 0.5% methanol) agar and grown at 30°C to induce production of the bacteriocins. After incubation of the plates at 30°C during 24 h, 40 mL of MRS soft-agar containing  $10^5$  cfu/mL of the indicator microorganism *Pediococcus damnosus* CECT4797 was added to the plates that were further incubated at 32°C for 24 h inhibition halos visualization.

**2.5. Purification of the Antimicrobial Activity of Supernatants from the Recombinant Yeasts.** The antimicrobial activity of supernatants from *P. pastoris* X-33 and *P. pastoris* X-33 (pPICZαA) and the recombinant *P. pastoris* X-33SRCAM602, *P. pastoris* X-33OR-7, *P. pastoris* X-33E-760, and *P. pastoris* X-33L-1077 was purified using a previously described procedure [12]. Briefly, supernatants from early stationary phase 0.5 L cultures of the recombinant yeasts, grown in BMMY buffered methanol complex medium at 30°C, were precipitated with ammonium sulfate, desalted by gel filtration, and subjected to cation exchange-chromatography, followed by hydrophobic interaction-chromatography and reverse phase-chromatography in a fast protein liquid chromatography system (RP-FPLC) (GE Healthcare, Barcelona, Spain). The antimicrobial activity of the purified fractions was evaluated against *Pediococcus damnosus* CECT4797 by the microtiter plate assay (MPA).

**2.6. Mass Spectrometry Analysis of Purified Supernatants.** For determination of the molecular mass of peptides in supernatants of the recombinant yeasts, the eluted purified fractions with antimicrobial activity were subjected to matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Briefly, 1 µL samples were spotted onto a MALDI target plate and allowed to air-dry at room temperature. Then, 0.4 µL of a 3 mg/mL of α-cyano-4-hydroxy-transcinnamic acid matrix (Sigma) in 50% acetonitrile were added to the dried peptide to digest spots and allowed again to air-dry at room temperature. MALDI-TOF MS analyses were performed in a 4800 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA), operated in 1KV reflector mode. All mass spectra were calibrated externally using a standard peptide mixture (AB Sciex, MA, USA).

To determine the amino acid sequence of the purified peptides, the eluted purified fractions with antimicrobial activity were further subjected to MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry. The samples were reduced, alkylated, digested with trypsin [23], and analysed in a 4800 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystems). The acquisition method for MS analysis was 1KV reflector positive mode. Peptides from the MS spectra were manually selected for fragmentation analysis. The acquisition method for MS/MS analysis was MS/MS-1KV in reflector positive mode with CID for fragmentation. The collision gas was atmospheric and the precursor mass window was ±5 Da. The plate model and default calibration were optimized for the MS/MS spectra processing. The parameters used to analyze the data were signal to noise = 20, resolution >6000. For protein identification, the *de novo* amino acid sequence from the fragmentation spectra of selected peptides was performed using the De Novo tool software (Applied Biosystems), and tentative sequences were manually checked and validated. Homology searches of the deduced amino acid sequences were performed through the NCBI/Blast. All mass spectrometry (MS) analyses were performed at the Unidad de Proteómica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Madrid, Spain.

**2.7. Antimicrobial Activity of Purified Supernatants from the Recombinant Yeasts.** The antimicrobial activity of purified supernatants from the recombinant *P. pastoris* X-33SRCAM602, *P. pastoris* X-33OR-7, *P. pastoris* X-33E-760, and *P. pastoris* X-33L-1077 was evaluated against *Listeria monocytogenes* CECT4032, *E. coli* O157:H7, *Yersinia ruckeri* LMG3279, *Campylobacter jejuni* ATCC33560, and *C. jejuni* NCTC11168 by using a MPA, as previously described [12].

### 3. Results

**3.1. Cloning of Synthetic Genes Encoding Bacteriocins and Their Expression by Recombinant *P. pastoris*.** The cloning of PCR-amplified fragments from plasmids encoding synthetic genes designed from the published amino acid sequence of the mature bacteriocins SRCAM 602, OR-7, E-760, and L-1077 into the protein expression vector pPICZαA resulted in the recombinant plasmids pSRCAM602, pOR-7, pE-760, and pL-1077 (Table 1). Similarly, transformation of the linearized plasmids into competent *P. pastoris* X-33 permitted isolation of the *P. pastoris* X-33SRCAM602 (*srcam602*), *P. pastoris* X-33OR-7 (*or-7*), *P. pastoris* X-33E-760 (*e-760*), and *P. pastoris* X-33L-1077 (*l-1077*) recombinants. However, none of the recombinant yeasts showed direct antimicrobial activity against *P. damnosus* CECT4797, even those recombinant yeasts selected for their high zeocin resistance (1,000 µg/mL). Colonies of *P. pastoris* X-33 and *P. pastoris* X-33 (pPICZαA) were used as bacteriocin-negative controls to discard the possibility that the antimicrobial activity possibly observed was due to metabolites other than bacteriocins.

**3.2. Purification of the Antimicrobial Activity of Supernatants from the Recombinant *P. pastoris* and Mass Spectrometry Analysis.** When supernatants from *P. pastoris* X-33SRCAM602, *P.*



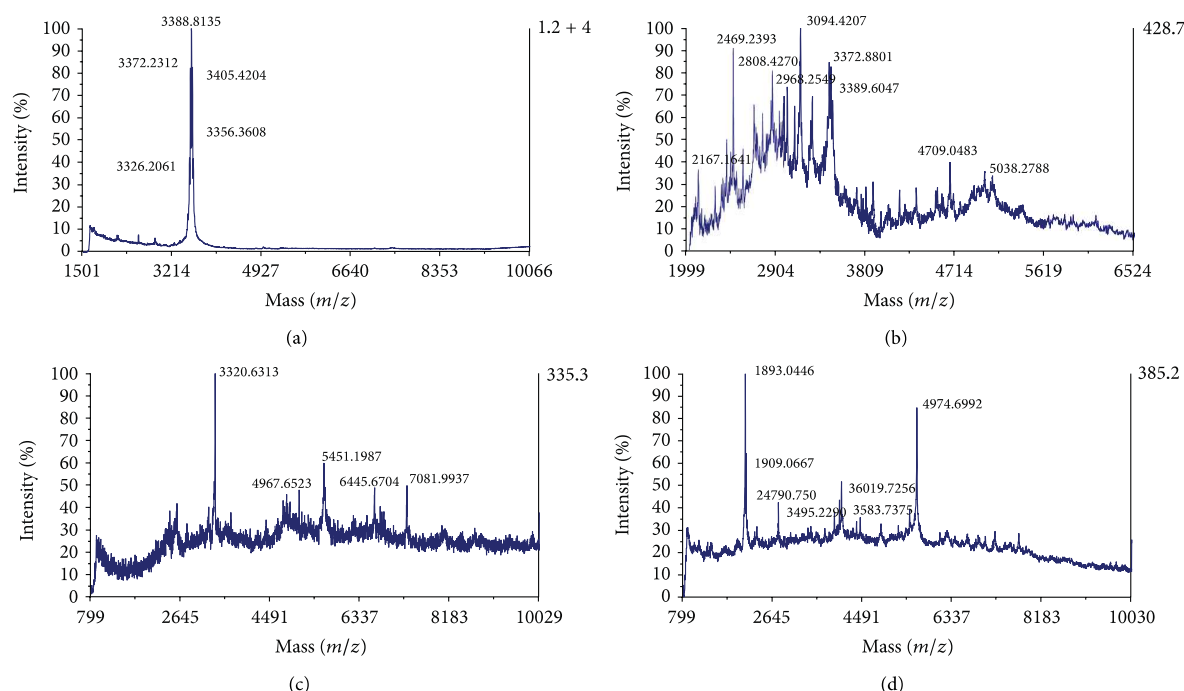


FIGURE 1: Mass spectrometry analysis of purified supernatants from *P. pastoris* X-33SRCAM602 (a), *P. pastoris* X-33OR-7 (c), *P. pastoris* X-33E-760 (b), and *P. pastoris* X-33L-1077 (d), eluted after RP-FPLC. Numbers indicate the molecular mass in daltons of most of the observed peptide fragments.

*pastoris* X-33OR-7, *P. pastoris* X-33E-76, and *P. pastoris* X-33L-1077 were purified by a multistep chromatographic procedure, only eluted fractions after the hydrophobic interaction-chromatography step showed full antimicrobial activity against *Pediococcus damnosus* CECT4797 as the indicator microorganism (Table 4). MALDI-TOF MS analysis of eluted fractions after the RP-FPLC step showed that supernatants from *P. pastoris* X-33SRCAM602 showed a major peptide fragment of 3388.8 Da (Figure 1(a)). However, the purified supernatant from *P. pastoris* X-33OR-7 showed a major peptide fragment of 3094.4 Da and peptide fragments of major and minor molecular mass (Figure 1(b)). Similarly, a large display of peptide fragments of different molecular masses was observed in the purified supernatants from *P. pastoris* X-33E-760 (Figure 1(c)) and *P. pastoris* X-33L-1077 (Figure 1(d)). MALDI-TOF MS/MS spectrometry analysis of trypsin-digested peptides from purified supernatants from all recombinant *P. pastoris*, determined that none of the most probable or *de novo* amino acid sequence of the evaluated peptide fragments matched the expected amino acid sequence of the bacteriocins SRCAM 602, OR-7, E-760, and L-1077 (Table 5). However, some of the determined peptide fragments were homologous to those observed in proteins from ABC-transporter systems, histidine kinase protein family, peptidase C1 superfamily, and nucleosome binding proteins.

**3.3. Antimicrobial Activity of Purified Supernatants from the Recombinant Yeasts.** The purified supernatants from

recombinant *P. pastoris*, constructed for expression of the bacteriocins SRCAM 602, OR-7, E-760, and L-1077 showed antimicrobial activity against *Pediococcus damnosus* CECT4797 but did not display a measurable antimicrobial activity against *L. monocytogenes* CECT4032, *E. coli* O157:H7, *Y. ruckeri* LMG3279, *C. jejuni* ATCC33560, and *C. jejuni* NCTC11168, when evaluated by a microtiter plate assay (MPA). The purified supernatants from *P. pastoris* X-33 and *P. pastoris* X-33 (pPICZαA) did not show antagonistic activity neither against *Pediococcus damnosus* CECT4797 nor against any of the indicator bacteria cited above.

#### 4. Discussion

To circumvent the proliferation of emerging pathogenic and antibiotic-resistant bacteria, bacteriocins produced by LAB emerge as natural antimicrobial peptides with potential applications in food preservation, livestock protection, and medical applications [1, 24]. However, the high cost of synthetic bacteriocin synthesis, their low yields, and the production of potential virulence factors from some natural bacterial producers drive the exploration of microbial systems for the biotechnological production of bacteriocins by heterologous LAB and yeasts [6, 8]. Furthermore, the use of synthetic genes may become a useful tool for production and functional expression of bacteriocins by heterologous microbial hosts [12].

The development of heterologous expression systems for bacteriocins may offer a number of advantages over

TABLE 3: Amino acid sequence of cloned bacteriocins and other class IIa bacteriocins.

Bacteriocin	Amino acid sequence	Number of amino acids
SRCAM 602	ATYY <u>GNGLY</u> CNKQKHYTWVDWNKASREIGKITVNGWVQH	39
OR-7	KTY <u>YGTNG</u> VHCTKNSLWGWKVRKLNMYDQNTTYMGRLQDILLGW ATGAFGKTFH	54
E-760	NRWYCNSAAGGVGGAAVCGLAGYVGEAKENIAGEVRKGWGMAGG FTHNKACKSFPGSWASG	62
E 50-52	TTKNY <u>GN</u> GVCSNVNWCQCGNVWASCNLATGCAAWLCKLA	39
L-1077	TNY <u>GN</u> GVGVPDAIMAGIHLIFIFNIRQGYNFGKKAT	37
EntP	ATRSY <u>GN</u> GVYCNNSKCWVNWGEAKENIAGIVISGWASGLAGMGH	44
EntA	TTHSGKYY <u>GN</u> GVYCYKNKCTVDWAKATTCIAGMSIGGFLGGAI PGKC	47
HirJM79	ATYY <u>GNGLY</u> CNKEKCWVDWNQAKGEIGKIIVNGWVNHGPWAP RR	44
SakA	ARSY <u>GN</u> GVYCNKKCWVNRGEATQSIIGGMISGWASGLAGM	41

Underlined, the class IIa N-terminal consensus sequence YGNV(X)C.

TABLE 4: Antimicrobial activity of fractions generated during purification of supernatants from *P. pastoris* X-SRCAM602, *P. pastoris* X-33OR-7, *P. pastoris* X-33E-760, and *P. pastoris* X-33L-1077, grown in BMMY with methanol.

Strain	Antimicrobial activity (BU/mL) of the purified fractions <sup>a</sup>					
	SN	AS	GF	SE	OE	RP-FPLC
<i>P. pastoris</i> X-33SRCAM602	NA	NA	NA	NA	12,800	1,106,531
<i>P. pastoris</i> X-33OR-7	NA	NA	127	32	1,391	10,027
<i>P. pastoris</i> X-33E-760	NA	NA	NA	NA	687	14,442
<i>P. pastoris</i> X-33L-1077	NA	NA	35	23	2,069	13,213

Most of the data are mean from two independent determinations in triplicate.

<sup>a</sup>Antimicrobial activity against *Pedococcus damnosus* CECT4797 as determined by microtiter plate assay (MPA). BU: bacteriocin units. NA: no activity.

Purification fractions: SN: supernatant; AS: ammonium sulfate precipitation; GF: gel filtration; SE: Sepharose fast flow eluate; OE: Octyl Sepharose eluate; RP-FPLC: reversed-phase eluate.

native systems, facilitating the control of bacteriocin gene expression or achieving higher production levels. Although a number of yeast platforms have been used for the production of peptides and proteins, including bacteriocins [10, 11, 25], the use of synthetic genes has been only barely explored for their expression by recombinant yeasts [12]. In this study, the protein expression vector pPICZαA containing an strong and inducible promoter and the Kex2 signal cleavage site for processing of fusion proteins [26] has been used to drive the expression of synthetic genes encoding the mature bacteriocins SRCAM 602, OR-7, E-760, and L-1077, by recombinant *P. pastoris* X-33 derivatives.

Initial results with *P. pastoris* X-33SRCAM602, *P. pastoris* X-33OR-7, *P. pastoris* X-33E-760, and *P. pastoris* X-33L-1077 determined that none of the recombinant yeasts, encoding synthetic genes for expression of the cloned bacteriocins, showed antimicrobial activity when individual colonies were screened by a streak-on-agar test (SOAT). Highly variable yields of secreted proteins have been achieved using the *P. pastoris* expression system and cases of low secretory yields or complete failure in protein production have also been reported [3, 27, 28]. A number of factors may affect the production of foreign peptides by heterologous yeasts including

copy number integration of the expression vectors in the yeast DNA, mRNA stability, errors in mRNA translation, uncoordinated rates of protein synthesis, folding and translocation, and undesired proteolysis of heterologous proteins by resident proteases or by proteases in the extracellular space being secreted, cell-wall associated, or released into the culture medium as a result of cell disruption [29–31]. The use of the *P. pastoris* expression system for overproduction of peptides and proteins is known to be somewhat hampered by its unpredictable yields of production of heterologous proteins, which is now believed to be caused in part by their varied efficiencies to traffic through the host secretion machinery [3, 28].

The amino acid sequence following the Kex2 secretion signal may also interfere with the secretion of fused peptides or proteins by recombinant *P. pastoris*. Furthermore, the yields of many recombinant proteins seem to be influenced by the Kex2 P1' site residue [3]. In this study, the Kex2 P1' site residues for mature SRCAM 602, OR-7, E-760, and L-1077 were the amino acids A, K, N, and T, respectively (Table 3). However, the cloning in *P. pastoris* of the bacteriocins enterocin A (EntA) and enterocin P (EntP) with the Kex2 P1' site residues A and T, respectively, showed an overproduction of

TABLE 5: Results obtained by MALDI-TOF/TOF MS analysis of the eluted RP-FPLC fractions from purified supernatants of the recombinant *P. pastoris* X-33 derivatives.

Bacteriocin	Predicted molecular mass (Da)	Trypsin-digested precursor (Da)	Amino acid sequence (MS/MS analysis)
SRCAM 602	4,630.1	926.65	SANALRPPT
		1,500.95	GDKENAAKASSVPAR
		1,614.97	KTGGNRAVSGAGEIAAR
OR-7	6,215.1	Deficient signal	—
E-760	6,179.8	1,166.63	VGNPLHGIFGR
		1,579.68	SLSAYMFFANEQR
L-1077	4,002.6	1,638.76	IVGSQAGIGEYLFER
		1,718.73	LVELSEQELVDCER

both bacteriocins over their natural producers and an intense antimicrobial activity when colonies of the recombinant yeasts were evaluated by the SOAT [11, 22].

The use of a multistep chromatographic procedure for purification of the expected antimicrobial activity in supernatants of the recombinant *P. pastoris* determined that only eluted fractions after the hydrophobic interaction-chromatography step showed full antimicrobial activity (Table 4), probably due to removal of antimicrobial inhibitors, disaggregation of the bacteriocins, or changes in conformation of the bacteriocins in the hydrophobic solvent. The antimicrobial activity of the supernatant from *P. pastoris* X-33SRCAM602 was much higher than that of the rest of the recombinant *P. pastoris*. While being interesting, this was not an unexpected observation since purification of the circular bacteriocin garvicin ML, produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, showed a higher antibacterial activity and a broader antimicrobial spectrum as it was increasingly purified [32]. However, MALDI-TOF MS analysis of the purified supernatants from *P. pastoris* X-33SRCAM602, *P. pastoris* X-33OR-7, *P. pastoris* X-33E-760, and *P. pastoris* X-33L-1077 mostly showed a large display of peptide fragments of different molecular mass than deduced from the calculated molecular mass of the cloned bacteriocins (Figure 1). The different molecular mass of the resulting peptide fragments may suggest the existence of truncated bacteriocins, the interaction of the bacteriocins with unknown biological compounds or the bacteriocins being subjected to posttranslational modifications (PTM) such as phosphorylation, acetylation, methylation, oxidation, formylation, disulfide bond formation, and N-linked and O-linked glycosylation [8, 33]. The presence of cysteine residues in the bacteriocins SRCAM 602, OR-7, and E-760 would permit the formation of disulfide bridges but also permits its oxidation, glutathionylation, and cysteinylation. The absence in all cloned bacteriocins of attachment sites for N-linkages precludes its N-glycosylation, but the presence of threonines and serines makes the bacteriocins sensitive to O-glycosylation [8, 12, 33].

However, MALDI-TOF MS/MS analysis of trypsin-digested peptides from purified supernatants from all recombinant *P. pastoris* determined that none of the evaluated peptide fragments matched the expected amino acid sequence

of the bacteriocins SRCAM 602, OR-7, E-760, and L-1077 (Table 5). From the results obtained it may be suggested that very low yields of secreted and/or purified bacteriocins are obtained after cloning of synthetic genes encoding the bacteriocins SRCAM 602, OR-7, E-760, and L-1077 in *P. pastoris*. This observation was also not unexpected because bacteriocins cloned into *Saccharomyces cerevisiae*, *P. pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, and *Arxula adeninivorans* have been produced with variable success regarding their production, secretion, and functional expression [11]. Furthermore, since one of the main bottlenecks in recombinant protein production is the inability of foreign peptides to reach their native conformation in heterologous yeast hosts, it could also happen that incorrectly folded SRCAM 602, OR-7, E-760, and L-1077 are accumulated in the endoplasmic reticulum (ER) of recombinant *P. pastoris*, activating the unfolded protein response (UPR) and the ER-associated degradation (ERDA) of the misfolded bacteriocins, leading to persistent ER stress conditions causing much lower efficiencies to traffic through the host secretion machinery, apoptosis, and cell death [8, 28, 34, 35]. In any case, the inconsistent secretory productivity among recombinant proteins has always been a major obstacle for routine application of *P. pastoris* as an eukaryotic protein expression system in both research and industry [3].

The purified supernatants from the recombinant *P. pastoris* constructed for expression of the bacteriocins SRCAM 602, OR-7, E-760, and L-1077 showed a measurable antimicrobial activity against *Pediococcus damnosus* CECT4797 (Table 4), but not against *L. monocytogenes* CECT4032, *E. coli* O157:H7, *Y. ruckeri* LMG3279, *C. jejuni* ATCC33560, and *C. jejuni* NCTC11168. One of the remarkable features of bacteriocins is that they are very potent, being active in nanomolar concentrations, thereby surpassing by about 1,000-fold the activity of AMPs produced by eukaryotic cells [36]. One of the major reasons for this extreme potency is that bacteriocins apparently recognize specific receptors on target cells, while the interactions between AMPs and microorganisms are mostly nonspecific. Furthermore, the target receptor for class IIa bacteriocins has been identified as proteins of the sugar transporter mannose phosphotransferase system (Man-PTS), with the most potent receptors being those found in *Listeria* spp. [37, 38]. However, the very low yields of secreted or

purified bacteriocins in supernatants of the recombinant *P. pastoris* may be responsible for their nondetected antilisterial activity.

It could be also hypothesized that peptide fragments aggregated to or coeluting with the purified bacteriocins may be responsible for the antimicrobial activity of the eluates against the sensitive indicator *Pediococcus damnosus* CECT4797, but not against any other of the indicator bacteria tested. Many proteins contain encrypted within their primary structure bioactive peptides with antimicrobial activity following hydrolytic release from the native molecule [39, 40]. Incorrect disulfide bond formation, misfolding of the secreted bacteriocin and extensive PTMs were suggested to be responsible for the lower antilisterial activity and the nonmeasurable antimicrobial activity against Gram-negative bacteria of the bacteriocin E 50-52 (BacE50-52), produced by recombinant *P. pastoris* X-33BE50-52S and *K. lactis* GG799BE50-52S [12]. This bacteriocin, originally produced by *Enterococcus faecium* B-30746, was also reported to display a high and broad antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, including *Campylobacter* spp. [20, 41].

The correct processing, secretion and functional expression of the bacteriocins EntP [22], hiracin JM79 (HirJM79) [42] and EntA [11], produced by recombinant yeasts, contrast with the low biological activity of the sakacin A (SakA) and the chimera EntP/SakA, produced by recombinant *P. pastoris* and *K. lactis* producers [8]. Misfolding of SakA and EntP/SakA and induction of the yeasts' UPR may be responsible for apoptosis in recombinant *P. pastoris* producers of SakA and for extensive PTMs in recombinant *P. pastoris* and *K. lactis*, producers of SakA and EntP/SakA [8]. These results, obtained by our research group, also contrast with the low antimicrobial activity against *Pediococcus damnosus* CECT4797 and the absence of antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria of the purified supernatants from recombinant *P. pastoris* encoding the mature bacteriocins SRCAM 602, OR-7, E-760, and L-1077.

Nevertheless, it should be also worth to notice that bacteriocins SRCAM 602 [16], OR-7 [17], E-760 [19], and L-1077 [18], although being reported as bacteriocins with a broad antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative microorganisms including *Campylobacter* spp., have not been fully characterized at their biochemical and genetic level, the genetic identification of their structural and adjacent genes has not been yet reported, and their molecular masses, deduced from their reported amino acid sequences, were not identical to the experimentally determined molecular mass from the purified bacteriocins [16–19]. Furthermore, recent reports suggest that bacteriocin SRCAM 602, previously reported to be produced by *Paenibacillus polymyxa* NRRL B-30509 and claimed to be responsible for inhibition of *C. jejuni*, could not be detected in the purified supernatants of the producer strain while the *srcam602* structural gene was not found via a PCR-based approach using degenerate nucleotide primers or by genomic sequencing of the bacteriocin producer [43]. Similarly, *Bacillus circulans* (now *Paenibacillus terrae*) NRRL B-30644 previously reported to produce SRCAM 1580,

a bacteriocin active against *C. jejuni* [16], has been recently suggested not to produce this bacteriocin and no genetic determinants for its production were shown. Instead the anti-*Campylobacter* activity of this strain is due to the production of the lipopeptide tridecaptin A1 whereas this strain also produces the novel lantibiotic paenicidin B, active against Gram-positive bacteria [44].

Although the cloning in recombinant yeasts of synthetic genes encoding bacteriocins drives the production, antimicrobial activity, and specific antimicrobial activity of the cloned bacteriocins in the absence of dedicated immunity and secretion proteins [12], these results contrast with the negligible antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria of purified supernatants from recombinant *P. pastoris* encoding the bacteriocins SRCAM 602, OR-7, E-760, and L-1077. Accordingly, since production of bacteriocins from synthetic bacteriocin genes is difficult to predict, further efforts should be performed for a more efficient genetically engineered production and functional expression of other bacteriocin synthetic genes or their chimeras by heterologous producer yeasts. The design of further and novel successful genetic approaches for production and functional expression of bacteriocins by yeasts would facilitate their biotechnological applications as natural antimicrobial agents in food, animal husbandry, and medicine.

## Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

## Acknowledgments

This work was partially supported by Project AGL2012-34829 from Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) and Project AGL2009-08348 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), by Grant GR35-10A from the BSCH-UCM and by Grants S2009/AGR-1489 and S2013/ABI-2747 from the Comunidad de Madrid (CAM). S. Arbulu holds a fellowship (FPI) from the MINECO. J. J. Jiménez and L. Gútiérrez held a fellowship from the MICINN and the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), Spain, respectively.

## References

- [1] C. T. Lohans and J. C. Vederas, "Development of class IIa bacteriocins as therapeutic agents," *International Journal of Microbiology*, vol. 2012, Article ID 386410, 13 pages, 2012.
- [2] P. D. Cotter, R. P. Ross, and C. Hill, "Bacteriocins-a viable alternative to antibiotics?" *Nature Reviews Microbiology*, vol. 11, no. 2, pp. 95–105, 2013.
- [3] S. Yang, Y. Kuang, H. Li et al., "Enhanced production of recombinant secretory proteins in *Pichia pastoris* by optimizing Kex2 PI' site," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 9, Article ID e75347, 2013.
- [4] P. D. Cotter, C. Hill, and R. P. Ross, "Food microbiology: bacteriocins: developing innate immunity for food," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 3, no. 10, pp. 777–788, 2005.
- [5] D. Drider, G. Fimland, Y. Héchar, L. M. McMullen, and H. Prévost, "The continuing story of class IIa bacteriocins,"

- Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 70, no. 2, pp. 564–582, 2006.
- [6] J. Borrero, J. J. Jiménez, L. Gútiez, C. Herranz, L. M. Cintas, and P. E. Hernández, “Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A in lactic acid bacteria,” *Journal of Biotechnology*, vol. 156, no. 1, pp. 76–86, 2011.
  - [7] N. S. Parachin, K. C. Mulder, A. A. B. Viana, S. C. Dias, and O. L. Franco, “Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides,” *Peptides*, vol. 38, no. 2, pp. 446–456, 2012.
  - [8] J. J. Jiménez, J. Borrero, D. B. Diep et al., “Cloning, production, and functional expression of the bacteriocin sakacin A (SakA) and two SakA-derived chimeras in lactic acid bacteria (LAB) and the yeasts *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*,” *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, vol. 40, no. 9, pp. 977–993, 2013.
  - [9] M. Gao and Z. Shi, “Process control and optimization for heterologous protein production by methylotrophic *pichia pastoris*,” *Chinese Journal of Chemical Engineering*, vol. 21, no. 2, pp. 216–226, 2013.
  - [10] M. Ahmad, M. Hirz, H. Pichler, and H. Schwab, “Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 98, pp. 5301–5317, 2014.
  - [11] J. Borrero, G. Kunze, J. J. Jiménez et al., “Cloning, production, and functional expression of the bacteriocin enterocin A, produced by *Enterococcus faecium* T136, by the Yeasts *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, and *Arxula adeninivorans*,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 78, no. 16, pp. 5956–5961, 2012.
  - [12] J. J. Jiménez, J. Borrero, L. Gútiez et al., “Use of synthetic genes for cloning, production and functional expression of the bacteriocins enterocin A and bacteriocin E 50-52 by *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*,” *Molecular Biotechnology*, vol. 56, no. 6, pp. 571–583, 2014.
  - [13] R. A. J. Darby, S. P. Cartwright, M. V. Dilworth, and R. M. Bill, “Which yeast species shall i choose? *Saccharomyces cerevisiae* versus *Pichia pastoris*,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 866, pp. 11–23, 2012.
  - [14] F. Öberg, J. Sjöhamm, M. T. Conner, R. M. Bill, and K. Hedfalk, “Improving recombinant eukaryotic membrane protein yields in *Pichia pastoris*: the importance of codon optimization and clone selection,” *Molecular Membrane Biology*, vol. 28, no. 6, pp. 398–411, 2011.
  - [15] N. J. Stern, E. A. Svetoch, B. V. Eruslanov et al., “*Paenibacillus polymyxa* purified bacteriocin to control *Campylobacter jejuni* in chickens,” *Journal of Food Protection*, vol. 68, no. 7, pp. 1450–1453, 2005.
  - [16] E. A. Svetoch, N. J. Stern, B. V. Eruslanov et al., “Isolation of *Bacillus circulans* and *Paenibacillus polymyxa* strains inhibitory to *Campylobacter jejuni* and characterization of associated bacteriocins,” *Journal of Food Protection*, vol. 68, no. 1, pp. 11–17, 2005.
  - [17] N. J. Stern, E. A. Svetoch, B. V. Eruslanov et al., “Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 50, no. 9, pp. 3111–3116, 2006.
  - [18] E. A. Svetoch, B. V. Eruslanov, V. P. Levchuk et al., “Isolation of *Lactobacillus salivarius* 1077 (NRRL B-50053) and characterization of its bacteriocin, including the antimicrobial activity spectrum,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 77, no. 8, pp. 2749–2754, 2011.
  - [19] J. E. Line, E. A. Svetoch, B. V. Eruslanov et al., “Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 52, no. 3, pp. 1094–1100, 2008.
  - [20] E. A. Svetoch, B. V. Eruslanov, V. V. Pereygin et al., “Diverse antimicrobial killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 bacteriocin,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, no. 6, pp. 1942–1948, 2008.
  - [21] E. A. Svetoch and N. J. Stern, “Bacteriocins to control *Campylobacter* spp. in poultry—a review,” *Poultry Science*, vol. 89, no. 8, pp. 1763–1768, 2010.
  - [22] J. Gutiérrez, R. Criado, M. Martín, C. Herranz, L. M. Cintas, and P. E. Hernández, “Production of enterocin P, an antilisterial pediocin-like bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13, in *Pichia pastons*,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 49, no. 7, pp. 3004–3008, 2005.
  - [23] A. Shevchenko, A. Loboda, W. Ens, and K. G. Standing, “MALDI quadrupole time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for proteomic research,” *Analytical Chemistry*, vol. 72, no. 9, pp. 2132–2141, 2000.
  - [24] World Health Organization (WHO), “Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014,” <http://www.searo.who.int/thailand/publications/2013/9789241564748/en/>.
  - [25] E. Böer, G. Steinborn, G. Kunze, and G. Gellissen, “Yeast expression platforms,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 77, no. 3, pp. 513–523, 2007.
  - [26] J. M. Cregg, J. L. Cereghino, J. Shi, and D. R. Higgins, “Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*,” *Applied Biochemistry and Biotechnology—Part B Molecular Biotechnology*, vol. 16, no. 1, pp. 23–52, 2000.
  - [27] O. J. Burrowes, G. Diamond, and T. C. Lee, “Recombinant expression of pleurocidin cDNA using the *Pichia pastoris* expression system,” *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2005, no. 4, pp. 374–384, 2005.
  - [28] K. R. Love, T. J. Politano, V. Panagiotou, B. Jiang, T. A. Stadheim, and J. C. Love, “Systematic single-cell analysis of *pichia pastoris* reveals secretory capacity limits productivity,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 6, Article ID e37915, 2012.
  - [29] H. A. Kang, E.-S. Choi, W.-K. Hong et al., “Proteolytic stability of recombinant human serum albumin secreted in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 53, no. 5, pp. 575–582, 2000.
  - [30] M. W. T. Werten and F. A. De Wolf, “Reduced proteolysis of secreted gelatin and Ypsl-mediated  $\alpha$ -factor leader processing in a *Pichia pastoris* *kex2* disruptant,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 5, pp. 2310–2317, 2005.
  - [31] Z. Ni, X. Zhou, X. Sun, Y. Wang, and Y. Zhang, “Decrease of hirudin degradation by deleting the KEX1 gene in recombinant *Pichia pastoris*,” *Yeast*, vol. 25, no. 1, pp. 1–8, 2008.
  - [32] J. Borrero, D. A. Brede, M. Skaugen et al., “Characterization of garvicin ML, a novel circular bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*),” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 77, no. 1, pp. 369–373, 2011.

- [33] Y. Zhao and O. N. Jensen, "Modification-specific proteomics: strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques," *Proteomics*, vol. 9, no. 20, pp. 4632–4641, 2009.
- [34] B. Gasser, M. Saloheimo, U. Rinas et al., "Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview," *Microbial Cell Factories*, vol. 7, article 11, 2008.
- [35] A. Stolz and D. H. Wolf, "Endoplasmic reticulum associated protein degradation: a chaperone assisted journey to hell," *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular Cell Research*, vol. 1803, no. 6, pp. 694–705, 2010.
- [36] E. Breukink, I. Wiedemann, C. van Kraaij, O. P. Kuipers, H.-G. Sahl, and B. de Kruijff, "Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic," *Science*, vol. 286, no. 5448, pp. 2361–2364, 1999.
- [37] D. B. Diep, M. Skaugen, Z. Salehian, H. Holo, and I. F. Nes, "Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 7, pp. 2384–2389, 2007.
- [38] M. Kjos, J. Borrero, M. Opsata et al., "Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria," *Microbiology*, vol. 157, no. 12, pp. 3256–3267, 2011.
- [39] M. Phelan, A. Aherne, R. J. FitzGerald, and N. M. O'Brien, "Casein-derived bioactive peptides: biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status," *International Dairy Journal*, vol. 19, no. 11, pp. 643–654, 2009.
- [40] G. D. Brand, M. T. Q. Magalhães, M. L. P. Tinoco et al., "Probing protein sequences as sources for encrypted antimicrobial peptides," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 9, Article ID e45848, 2012.
- [41] E. A. Svetoch, V. P. Levchuk, V. D. Pokhilenko et al., "Inactivating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other pathogens by use of bacteriocins OR-7 and E 50-52," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 46, no. 11, pp. 3863–3865, 2008.
- [42] J. Sánchez, J. Borrero, B. Gómez-Sala et al., "Cloning and heterologous production of hiracin JM79, a Sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, in lactic acid bacteria and *Pichia pastoris*," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, no. 8, pp. 2471–2479, 2008.
- [43] C. T. Lohans, Z. Huang, M. J. Van Belkum et al., "Structural characterization of the highly cyclized lantibiotic paenicidin A via a partial desulfurization/reduction strategy," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 134, no. 48, pp. 19540–19543, 2012.
- [44] C. T. Lohans, M. J. Van Belkum, S. A. Cochrane et al., "Biochemical, structural, and genetic characterization of tridecaptin A<sub>1</sub>, an antagonist of *Campylobacter jejuni*," *ChemBioChem*, vol. 15, no. 2, pp. 243–249, 2014.



# CAPÍTULO *CHAPTER*

V

**ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL EN SOLUCIÓN DE LA  
ENTEROCINA HF, UNA BACTERIOCINA CON ELEVADA  
ACTIVIDAD ANTILISTERIANA PRODUCIDA POR  
*Enterococcus faecium* M3K31**

---

***SOLUTION STRUCTURE OF ENTEROCIN HF, AN  
ANTILISTERIAL BACTERIOCIN PRODUCED BY *Enterococcus*  
*faecium* M3K31***





# Solution Structure of Enterocin HF, an Antilisterial Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium* M3K31

Sara Arbulu,<sup>†,||</sup> Christopher T. Lohans,<sup>§,||</sup> Marco J. van Belkum,<sup>§</sup> Luis M. Cintas,<sup>†</sup> Carmen Herranz,<sup>†</sup> John C. Vederas,<sup>\*,§</sup> and Pablo E. Hernández<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Avenida Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

<sup>§</sup>Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada T6G 2G2

## Supporting Information

**ABSTRACT:** The solution structure of enterocin HF (EntHF), a class IIa bacteriocin of 43 amino acids produced by *Enterococcus faecium* M3K31, was evaluated by CD and NMR spectroscopy. Purified EntHF was unstructured in water, but CD analysis supports that EntHF adopts an  $\alpha$ -helical conformation when exposed to increasing concentrations of trifluoroethanol. Furthermore, NMR spectroscopy indicates that this bacteriocin adopts an antiparallel  $\beta$ -sheet structure in the N-terminal region (residues 1–17), followed by a well-defined central  $\alpha$ -helix (residues 19–30) and a more disordered C-terminal end (residues 31–43). EntHF could be structurally organized into three flexible regions that might act in a coordinated manner. This is in agreement with the absence of long-range nuclear Overhauser effect signals between the  $\beta$ -sheet domain and the C-terminal end of the bacteriocin. The 3D structure recorded for EntHF fits emerging facts regarding target recognition and mode of action of class IIa bacteriocins.

**KEYWORDS:** bacteriocins, enterocin HF, CD, circular dichroism, NMR, nuclear magnetic resonance, 3D structure of enterocin HF

## ■ INTRODUCTION

Bacteriocins form a group of ribosomally synthesized antimicrobial peptides produced by a great variety of bacteria.<sup>1</sup> Those produced by lactic acid bacteria (LAB) attract considerable interest primarily as natural and nontoxic food preservatives<sup>2</sup> and also for their potential application as therapeutic antimicrobial agents for human and veterinary applications and in the animal production field.<sup>3–5</sup> Bacteriocins are very diverse in size, structure, and specificity and exhibit antimicrobial activity at pico- to nanomolar concentrations.

Most bacteriocins produced by LAB are synthesized as biologically inactive precursors or prepeptides containing an N-terminal extension that is cleaved off during export to generate their biologically active or mature form. They are generally divided into two main classes.<sup>6</sup> Class I consists of the lanthionine-containing post-translationally modified bacteriocins or lantibiotics, whereas class II consists of the bacteriocins containing nonmodified amino acids. The class II bacteriocins may be further subdivided into the pediocin-like (class IIa) bacteriocins, the two-peptide (class IIb) bacteriocins, the cyclic (class IIc) bacteriocins, and the non-pediocin-like one-peptide linear (class IId) bacteriocins.<sup>7</sup> However, additional subgroups have been suggested for leaderless peptides, circular bacteriocins, linear peptides derived from large proteins, and the glycosylated bacteriocins.<sup>8</sup> The class IIa bacteriocins are the best studied group of LAB-produced bacteriocins due to their strong antilisterial activity.

Circular dichroism (CD) spectroscopy and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopic structural analysis of the class IIa bacteriocins evaluated to date reveal them to be unstructured in water, but structured in membrane-mimicking

solvents.<sup>9,10</sup> The structures of class IIa bacteriocins seem to consist of a N-terminal-sheet-like domain structurally stabilized by the conserved disulfide bridge and a more random C-terminal domain with one or two  $\alpha$ -helices, often ending with an extended C-terminal tail.<sup>9,11–13</sup> However, despite similarity in their amino acid sequences (40–60%), they do not exhibit a common fold and, thus, a common three-dimensional (3D) structure cannot be predicted. Accordingly, a deeper knowledge of the 3D structure and mode of action of bacteriocins may be important for the approval of new commercial bacteriocins and the rational design of bacteriocin variants for different biotechnological applications.

In this work we have determined the 3D structure of the class IIa bacteriocin enterocin HF (EntHF), produced by *Enterococcus faecium* M3K31. On the basis of the nucleotide sequence of the EntHF cluster (Genbank accession no. KJ442693 and P86183), EntHF is encoded as a 58 amino acid precursor peptide consisting of a N-terminal double-glycine leader of 15 amino acid residues followed by the mature peptide sequence. The mature bacteriocin contains 43 amino acid residues, the calculated pI is 9.63, and the predicted monoisotopic molecular mass is 4328.16 Da. EntHF contains the N-terminal conserved motif YGNGV as well as the two conserved cysteine residues (positions 9 and 14), typical of class IIa bacteriocins.

**Received:** August 7, 2015

**Revised:** November 16, 2015

**Accepted:** November 19, 2015

**Published:** November 19, 2015

## MATERIALS AND METHODS

**Purification of Enterocin HF.** The *E. faecium* M3K31 strain, producer of EntHF, was isolated during the evaluation of active bacteriocinogenic LAB strains isolated from the feces of griffon vultures (*Gyps fulvus* subspecies *fulvus*) and taxonomically identified by sequencing of the genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and superoxide dismutase (*sodA*) (data not shown). Cell-free supernatants from *E. faecium* M3K31 showed a high antilisterial effect (data not shown). The bacteriocin EntHF was purified to homogeneity using a previously described procedure.<sup>14</sup> Briefly, 10 mL of de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) medium<sup>15</sup> (BD Difco, Sparks, MD, USA) was inoculated with a  $-80^{\circ}\text{C}$  glycerol stock of *E. faecium* M3K31 and grown overnight without shaking at  $37^{\circ}\text{C}$ . This culture was inoculated (1%, v/v) into 1 L of MRS and incubated without shaking for 16 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . After centrifugation (10000g, 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ), the cell-free supernatant was loaded onto an SP Sepharose Fast Flow column (20 mL resin, 1 mL/min; Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, USA) pre-equilibrated with 20 mM sodium phosphate (pH 6.9). The column was washed with 100 mL of 20 mM sodium phosphate (pH 6.9) and then with 100 mL of 20 mM sodium phosphate (pH 6.9) with 0.2 M NaCl. The bacteriocin was eluted with 100 mL of 20 mM sodium phosphate (pH 6.9) with 1.0 M NaCl. The eluted fraction was loaded onto a Strata C18-E (55  $\mu\text{m}$ , 70 Å), 10 g/60 mL Giga Tube (Phenomenex, Torrance, CA, USA) cartridge, preconditioned with 50 mL of methanol and 100 mL of deionized water, and successively washed with 50 mL of each of the following solvents: 30% ethanol, 30% acetonitrile, and 40% isopropyl alcohol (IPA). EntHF was eluted from the cartridge using 50 mL of 80% IPA acidified with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). The 80% IPA, 0.1% TFA eluted fraction was concentrated in vacuo to approximately 10 mL. The EntHF was purified by HPLC using a Vydac C18 Peptide & Protein column (5  $\mu\text{m}$ , 300 Å, 4.6 mm  $\times$  250 mm; Grace Vydac, Columbia, MD, USA).

The organic solvent in the eluted fraction was removed in vacuo, and the remainder was lyophilized. Approximately 1.2 mg of bacteriocin was obtained per liter of medium. The identity and purity of the eluted EntHF were confirmed by mass spectrometry using a MALDI-TOF Voyager-Elite mass spectrometer (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA). The antimicrobial activity of the purified EntHF was evaluated after each chromatographic step by the spot-on-lawn method,<sup>16</sup> using *Pediococcus damnosus* CECT4797 as the indicator microorganism.

**Circular Dichroism (CD) Spectroscopy.** CD spectra were recorded on an OLIS DSM 17 CD spectrophotometer (Olis, Inc., Bogart, GA, USA). All measurements were analyzed in a 0.2 mm quartz cuvette with a path length of 0.1 cm. Purified EntHF at a concentration of 0.4 mg/mL was prepared in mQ H<sub>2</sub>O and in 25, 50, and 75% trifluoroethanol (TFE). The percentage of  $\alpha$ -helicity was calculated as  $(3000 - \theta_{222})/39000$ .<sup>17</sup>

**NMR Spectroscopy.** All NMR experiments were performed at  $27^{\circ}\text{C}$  on a Varian VNMR 700 MHz spectrometer with VNMRJ 3.2 host control and equipped with a triple-resonance HCN cryogenically cooled probe and Z axis pulsed-field gradients (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). A solution containing 2 mg of pure EntHF was prepared to a final concentration of 0.76 mM in 600  $\mu\text{L}$  of H<sub>2</sub>O plus 300  $\mu\text{L}$  of D<sub>2</sub>-TFE. An internal reference standard of 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid (DSS) was included at a final concentration of 0.01% w/v. Standard 5 mm NMR tubes were used for the experiments. One-dimensional <sup>1</sup>H NMR and two-dimensional homonuclear <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H total correlation spectroscopy (TOCSY) and nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) data sets were acquired. NMRPipe<sup>18</sup> and NMRView<sup>19</sup> were used for data processing and analysis. Chemical shift assignments were done manually.<sup>20,21</sup>

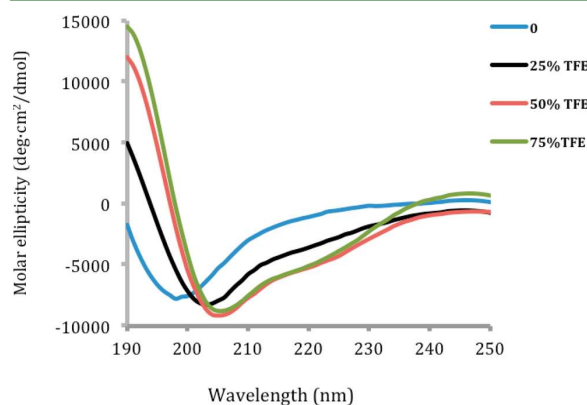
**Structure Calculations.** CYANA 2.1<sup>22</sup> was used to calculate the 3D structure of EntHF by using a combination of manually and automatically assigned nuclear Overhauser effect (NOE) cross-peaks. Seven cycles were done with 10000 steps per cycle. A total of 1331 NOE cross-peaks were used for the final calculation, 647 short-range, 115 medium range, and 24 long-range. PyMOL<sup>23</sup> was used to generate the figures for the 3D structure of EntHF. Adaptive Poisson–

Boltzmann Software (APBS) was used for the electrostatic surface calculations.<sup>24</sup>

**Data Bank Accession Numbers.** The coordinates for the calculated structure were deposited in the Protein Data Bank (accession no. 2N4K), whereas the chemical shift assignments were deposited in the Biological Magnetic Resonance Data Bank (accession no. 25670).

## RESULTS

Mature EntHF, produced by *E. faecium* M3K31, was purified to homogeneity by cation exchange and hydrophobic interaction chromatography, and the purity and identity of the peptide were confirmed by MALDI-TOF MS ( $[M + H]^+ = 4328.1$ ) (data not shown). To determine optimal conditions for NMR studies, the peptide was first analyzed by CD spectroscopy using TFE as a structure-inducing cosolvent. Purified EntHF was barely structured in water but adopted an  $\alpha$ -helical structure with increasing concentrations of TFE (Figure 1); the



**Figure 1.** CD spectra of enterocin HF in various concentrations of TFE: 0% (blue), 25% (black), 50% (red), 75% (green).

peptide showed 20%  $\alpha$ -helicity with 50% TFE. No meaningful structural difference was found between 50 and 75% of TFE; therefore, NMR spectroscopy was performed with 50% TFE. It is also worth mentioning that attempts to prepare isotopically labeled EntHF by growing *E. faecium* M3K31 in Celtone Complete medium (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Tewksbury, MA, USA) were unsuccessful. However, the good dispersion of the amide proton chemical shifts in the 1D proton NMR spectra and the absence of overlap in the TOCSY and NOESY data sets acquired for this peptide permitted the elucidation of the solution structure of EntHF by a homonuclear approach, without the requirement for isotopic sample labeling. The NMR procedure basically consisted of two steps. First, the individual residues were recognized because they give rise to specific patterns of cross-peaks in the TOCSY data set. Second, through-space interactions between atoms that are in proximity to each other (e.g., backbone amide protons and protons of neighboring residues) resulted in cross-peaks in the NOESY data set. All NH to NH sequential connectivities could be established. The side-chain proton chemical shifts of Lys38 and Lys42 could not be distinguished due to overlapping resonances. Chemical shifts were manually assigned on the basis of the standard identification of spin systems in the TOCSY data set and ordering of the spin systems based on inter-residue NH–NH( $i, i + 1$ ),  $\alpha\text{H}$ –NH( $i, i + 1$ ), and  $\beta\text{H}$ –NH( $i, i + 1$ ) NOE cross-peaks. A peak list

containing all of the NOE cross-peaks and the proton chemical shift assignments were run on CYANA 2.1.18. Chemical shifts (Table S1) and the Ramachandran plot (Figure S2) are shown in the Supporting Information. The statistics describing the structure calculation are shown in Table 1, and the fingerprint region is shown in Figure S3.

**Table 1.** Structure Calculation Statistics for Enterocin HF

total NOE peak assignment	1331
short-range, $ i-j  \leq 1$	647
medium-range, $1 <  i-j  < 5$	115
long-range, $ i-j  \geq 5$	24
average target function value	0.13
RMSD for residues 19–30 ( $\alpha$ -helix)	
backbone atoms (Å)	$0.63 \pm 0.16$
heavy atoms (Å)	$0.98 \pm 0.19$

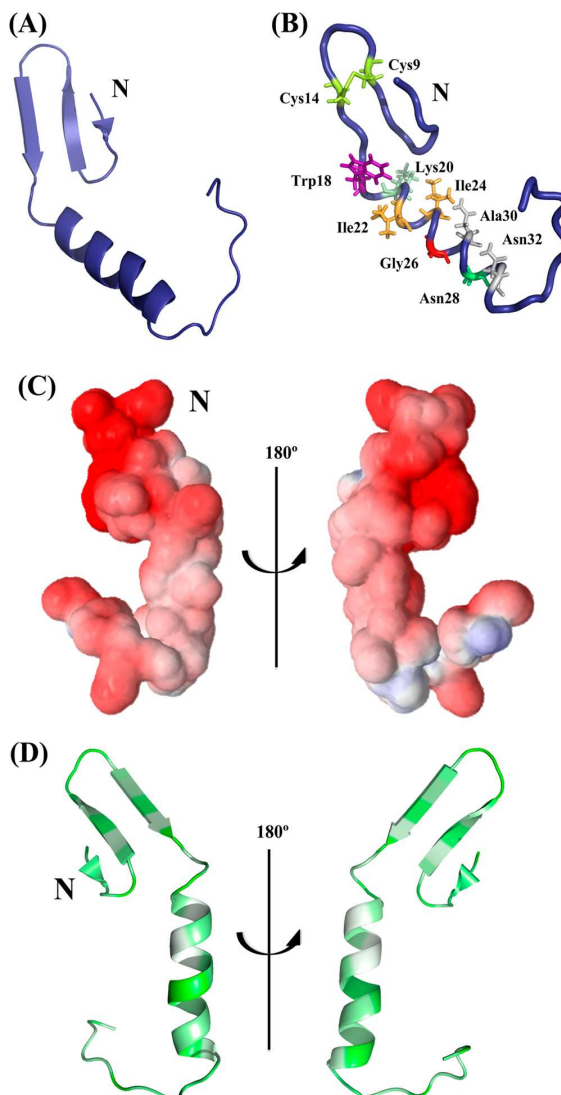
From the recorded NMR results, the structure of the purified EntHF features an N-terminal antiparallel  $\beta$ -sheet-like structure with many medium- and long-range NOEs (e.g., Tyr3 NH to Val7 H $\gamma$ , Val7 H $\alpha$  to Ser15 NH, Ser8 HN to Cys14 H $\beta$ ), stabilized by the disulfide bond formed between cysteines 9 (C9) and 14 (C14). Following the N-terminal part of the bacteriocin, there is a well-defined amphipathic central  $\alpha$ -helix (RMSD of 0.63 Å), consistent with the high number of typical short-range NOEs (e.g.,  $\alpha$ H–NH( $i, i + 3$ ),  $\alpha$ H– $\beta$ H( $i, i + 3$ )) between residues 19 and 30. The C-terminal tail (residues 31–43) of EntHF is more disorganized and unstructured. No medium- or long-range NOEs are observed for this region, suggesting that the C-terminal tail exists as a random coil. According to these results, the resulting solution structure of the purified mature EntHF is as shown in Figure 2A,B.

Electrostatic potential maps suggest that the surface of this peptide is cationic (Figure 2C), although there are some relatively uncharged patches on the surface. EntHF has a total of six lysines distributed through the peptide sequence, which contribute the most to this cationic character. Hydrophobic surface maps show the amphipathic character of this peptide (Figure 2D), revealing areas of hydrophobic and hydrophilic amino acids.

The overlay of the 20 structures calculated by CYANA does not show a strongly defined overall structure, suggesting that the N-terminal  $\beta$ -sheet region, the central  $\alpha$ -helix region, and the C-terminal part of the purified EntHF are quite flexible and independent from each other (Figure 3 shows the overlay of the  $\alpha$ -helix and Figure S4 shows the overlay of the  $\beta$ -sheet). The absence of long-range NOEs cross-peaks between the N-terminal  $\beta$ -sheet region and the central  $\alpha$ -helix suggests that Asp17 may be playing a hinge role separating these regions, as has been shown for other class IIa bacteriocins.<sup>10</sup> In the same sense, no NOE cross-peaks were found between the C-terminal tail and the central  $\alpha$ -helix, suggesting that the C-terminal tail of the EntHF might act in a more independent way.

## DISCUSSION

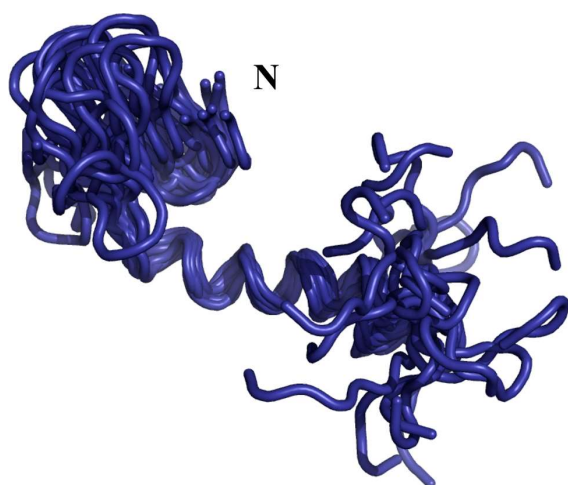
To date, the 3D structures of several bacteriocins have been determined including the class IIa bacteriocins leucocin A (LeuA),<sup>9</sup> carnobacteriocin B2 (CbnB2),<sup>11</sup> sakacin P (SakP) and its variant, termed SakP (N24C + 44C),<sup>12</sup> and curvacin A (CurA).<sup>13</sup> In addition, the 3D structure of several two-peptide class IIb bacteriocins,<sup>10</sup> circular class IIc bacteriocins,<sup>25,26</sup> and linear leaderless class IId bacteriocins<sup>14,27</sup> have been also



**Figure 2.** Solution structure of enterocin HF (A, B). In the electrostatic potential surface maps of enterocin HF (C), cationic regions are indicated in red and anionic regions in blue. In the hydrophobic surface maps (D), hydrophobic residues are indicated in white and hydrophilic residues in green. The N-terminus is indicated by N.

solved. Overall, all evaluated class IIa bacteriocins are unstructured in aqueous solutions but structured when exposed to membrane-mimicking solvents. It has been determined that SakP and LeuA form a three-stranded  $\beta$ -sheet-like structure in their N-terminal part stabilized by a disulfide bond between cysteines 9 and 14. Both peptides also contain a central  $\alpha$ -helix region ending with a C-terminal tail, which folds back onto the central  $\alpha$ -helix, creating a hairpin-like structure.<sup>9,12</sup> On the other hand, CbnB2 shows a central  $\alpha$ -helix flanked by relatively unstructured N- and C-termini, whereas CurA displays an N-terminus  $\beta$ -sheet-like structure followed by a helix–hinge–helix C-terminus.<sup>11,13</sup> Thus, it seems that class IIa bacteriocins contain two distinct domains separated by a flexible hinge. The first domain consists of a highly conserved, cationic N-terminal





**Figure 3.** Overlay of the  $\alpha$ -helical region of the 20 structures calculated by CYANA. The N-terminus indicated by N.

region structured as an antiparallel  $\beta$ -sheet stabilized by a disulfide bridge. The second domain, which has less sequence conservation, contains one or two  $\alpha$ -helices that form a hairpin or a functionally equivalent helix–hinge–helix structure. The alignment of class IIa bacteriocins with known 3D structure is shown in Table 2.

However, data obtained from other class II bacteriocins suggest that the two-peptide class IIb bacteriocins generally form a helix–helix structure<sup>14</sup> and that most circular class IIc bacteriocins share a compact globular structure consisting of repeated  $\alpha$ -helical motifs surrounding a hydrophobic core.<sup>26,28</sup> Leaderless class IId bacteriocins, such as enterocins 7A and 7B, are highly structured in aqueous solutions and are almost completely  $\alpha$ -helical, adopting a similar overall fold.<sup>14</sup> However, other leaderless bacteriocins such as LsbB showed an N-terminal  $\alpha$ -helix structure, whereas the C-terminal end of the molecule remains unstructured in water and in structure-inducing conditions (TFE and DPC).<sup>27</sup>

EntHF is a class IIa bacteriocin with a disulfide bond in the N-terminal (C9–C14) region and a tryptophan at position 41 of the molecule, showing strong sequence similarity with other class IIa bacteriocins for which 3D structures have not yet been solved. In this context, mature EntHF is 91% identical to mundticin KS/enterocin CRL35<sup>29,30</sup> and 90% identical to mundticin L<sup>31</sup> and avicin A.<sup>32</sup> These bacteriocins display a high antilisterial activity, and enterocin CRL35 has even been postulated as a promising alternative agent for the in vivo prevention of *Listeria* spp. infections.<sup>33</sup> Accordingly, the results obtained in this work support that EntHF assumes a defined

conformation upon interaction with structure-inducing solvents, and the bacteriocin adopts an  $\alpha$ -helix conformation when exposed to TFE (Figure 1). Furthermore, the NMR results indicate that EntHF adopts an antiparallel  $\beta$ -sheet-like structure in the N-terminal region, a well-defined central  $\alpha$ -helix region, and an unstructured C-terminal part (Figure 2A,B). The lack of a hairpin structure in the C-terminus of EntHF, as observed for SakP (72% amino acid sequence homology) and LeuA (41% amino acid homology), was unexpected. However, differences in the C-terminus have been observed for SakP and LeuA using different solvents (TFE and DPC micelles). SakP and LeuA showed the hairpin C-terminus structure only when exposed to DPC micelles but not in TFE.<sup>9,12</sup> The hairpin structure is stabilized in some class IIa bacteriocins such as enterocin A, pediocin PA-1, and divercin V41 by a second disulfide bridge between a cysteine in the central  $\alpha$ -helix and a C-terminal cysteine.<sup>34</sup> However, most class IIa bacteriocins lack this extra disulfide bond and have instead a tryptophan near the C-terminus, which assists the interaction of the bacteriocin with bacterial membranes.<sup>35</sup>

It has been hypothesized that due to their highly specific and narrow spectra, most, if not all, class II bacteriocins utilize specific receptor molecules on target cells to induce pore formation or disruption of the integrity of target cell membranes.<sup>36,37</sup> However, only a few specific target receptors for class II bacteriocins have been reported. To date, these are proteins of the sugar transporter mannose phosphotransferase system (Man-PTS) targeted by the class IIa bacteriocins and the class IId lactococcins A and B;<sup>38,39</sup> the undecaprenyl pyrophosphate phosphatase, a membrane protein involved in peptidoglycan synthesis targeted by the two-peptide bacteriocins lactococcin G and enterocin 1071;<sup>40</sup> the maltose-ABC transporter, recognized by the circular bacteriocin garvicin ML;<sup>41</sup> and a membrane-bound Zn-dependent metalloproteinase, targeted by the leaderless bacteriocin LsbB and possibly other leaderless bacteriocins with homologous C-termini.<sup>27,42</sup>

For class IIa bacteriocins it has been reasoned that their  $\beta$ -sheet-like N-terminal domain mediates initial binding to the target cell,<sup>10,37</sup> whereas the helix-containing C-terminal half penetrates into the hydrophobic core of target-cell membranes, docks to domains IIC and IID of the Man-PTS, and causes disruption of membrane integrity, leakage of solutes, and eventually death of sensitive cells.<sup>38,39</sup> Studies with synthetic analogues of LeuA have shown that the antimicrobial activity of class IIa bacteriocins is dependent on their entire amino acid sequence and that for bacteriocins with a propensity to form a  $\beta$ -turn in the N-terminal end, substitution of the cysteine disulfide bridge (9C–14C) with hydrophobic interactions may assist attainment of the correct conformation for activity.<sup>43</sup> Studies on the 3D solution structures of the inactive (C9S,

**Table 2.** Sequence Alignment of Class IIa Bacteriocins with Known 3D Solution Structure<sup>a</sup>

Bacteriocin name	Amino acid sequence	Length (aa)
Carnobacteriocin B2	VN <b>YNGV</b> S <b>C</b> SKTK <b>C</b> SVN <b>WGQAFQERYTAGINSFVSGVASGAGSIGRRP</b>	48
Curvacin A	ARS <b>YNGVY</b> C <b>NNKK</b> <b>C</b> WVNRGEATQSIIGGMIS <b>CWASGLAGM</b>	41
Leucocin A	KY <b>YNGVH</b> C <b>TKSG</b> <b>C</b> SVN <b>WGEAFSAGVHRLANGGN</b> <b>FW</b>	36
Sakacin P	KY <b>YNGVH</b> C <b>GKHS</b> <b>C</b> TVD <b>WGTAIGNIGNNAAANWATGGNAG</b> <b>WNK</b>	43
Sakacin P (N24C+44C)	KY <b>YNGVH</b> C <b>GKHS</b> <b>C</b> TVD <b>WGTAIG</b> <b>C</b> IGNNAAAN <b>WATGGNAG</b> <b>WNK</b> <b>C</b>	44
Enterocin HF	KY <b>YNGV</b> S <b>C</b> NNK <b>C</b> SVD <b>WGKAIGIIGNNAAANLTTGGKAG</b> <b>WKG</b>	43

<sup>a</sup>The conserved sequence YNGV is highlighted in yellow, cysteines in red, and tryptophans in blue.

C14S)-LeuA unstructured peptide and the active (C9L, C14L)-LeuA peptide suggest that formation of a structured  $\alpha$ -helix in the N-terminal domain can substitute for the role of the  $\beta$ -sheet and that a leucine (L) to leucine (L) interaction can substitute for a disulfide bridge.<sup>44</sup> Thus, the tolerance for structural changes in the N-terminal domain of class IIa bacteriocins and the role of their N-termini in their antimicrobial activity is not yet fully understood.<sup>44</sup> Further experiments with synthetic analogues, based on the known amino acid sequence of EntHF, would determine if this is also the behavior for this similarly structured class IIa bacteriocin at the N-terminal end.

On the other hand, competition binding studies, site-directed in vitro mutagenesis, isolation of bacteriocin-resistant mutants, and genetic complementation results support that interaction of the C-terminal part of class IIa bacteriocins with their target-cell receptors occurs in an amino acid sequence-dependent manner. Some amino acids are more important than others in this interaction, and the membrane-embedded part (C and D subunits) of the Man-PTS permeases of sensitive bacterial cells acts as a host-specific receptor or target molecule of the class IIa bacteriocins.<sup>13,38,39</sup> The C-terminal domains of class IIa bacteriocins are also involved in specific recognition by their cognate immunity proteins and in determining their antimicrobial spectra.<sup>40,45</sup> Furthermore, Man-PTS permeases are not found in eukaryotes, so class IIa bacteriocins could potentially be ideal peptides to target and kill bacterial pathogens without disturbing the mammalian host.<sup>40</sup> Moreover, the differences noted on the C-terminal end of EntHF, as compared to the solved 3D structures of other class IIa bacteriocins, would be useful to perform further studies on the reactivity of this bacteriocin or synthetic analogues on the extracellular loops and transmembrane segments of Man-PTS permeases of target cells and on the evaluation of their sensitivity and antimicrobial spectra.

Detailed interactions between amino acid residues of the C-terminal end of class IIa bacteriocins and their specific membrane-located receptors remain poorly understood. Differences observed in the 3D structures of the evaluated class IIa bacteriocins, including EntHF, may also be due to the different conditions in which their structures were solved, mainly TFE and DPC micelles, NMR conditions (e.g., different temperatures), and the amino acid composition and sequence of the bacteriocin itself.<sup>36</sup> In this context, modifications of the amino acid composition of the C-terminal end of class IIa bacteriocins may alter the manner and/or extent to which bacteriocins interact with putative or cognate receptors and even with cognate immunity proteins in the membrane of target cells.<sup>13,39</sup> This would explain why the antimicrobial spectra of similar class IIa bacteriocins and the susceptibility of sensitive cells to a given bacteriocin vary much more than would be expected from their known amino acid sequences.

The evaluation of bacteriocin–bacteria interactions using engineered surface-immobilized peptide fragments confirms that the C-terminal region of class IIa bacteriocins (including the  $\alpha$  helix region and the very C-terminal end), such as LeuA, is mainly responsible for receptor and bacterial binding and opens the possibility of developing peptide-based biosensors for the on-site rapid detection of pathogenic bacteria such as *Listeria* spp.<sup>46</sup> Knowledge of the 3D structure of different class IIa bacteriocins would further improve the understanding of their interaction with host-specific receptors and their structure–activity relationships (SAR), laying the groundwork for a rational, safe, and efficient use of these antimicrobial

peptides. Moreover, because class IIa bacteriocins are primary metabolites of a linear and peptidic nature, they are suitable for the rational development of novel bacteriocins with increased target specificity and antimicrobial activity by peptide bioengineering.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jafc.5b03882.

Chemical shift assignments, Ramachandran plots, and fingerprint region of TOCSY and NOESY NMR spectra (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Authors

\*(J.C.V.) E-mail: john.vederas@ualberta.ca.

\*(P.E.H.) E-mail: ehernan@vet.ucm.es.

### Author Contributions

§S.A. and C.T.L. contributed equally.

### Funding

Financial support was provided by Project AGL2012-34829 from the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) and by Grant S2013/ABI-2747 from the Comunidad de Madrid (CAM), Spain. The project was also supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Canada Research Chair in Bioorganic and Medicinal Chemistry, Canada. S.A. held a fellowship (FPI) from the MINECO, Spain.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ryan T. McKay and Mark Miskolzie from the Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada, for their NMR technical support.

## ■ ABBREVIATIONS USED

CD, circular dichroism spectroscopy; CbnB2, carnobacteriocin B2; CurA, curvacin A; DPC, dodecylphosphocholine; DSS, 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid; EntHF, enterocin HF; HCN, hydrogen cyanide; HN, backbone amide proton; HPLC, high-performance liquid chromatography; IPA, isopropyl alcohol; LAB, lactic acid bacteria; LeuA, leucocin A; NMR, nuclear magnetic resonance; NOE, nuclear Overhauser effect; NOESY, nuclear Overhauser effect spectroscopy; RMSD, root-mean-square deviation; SakP, sakacin P; TFA, trifluoroacetic acid; TFE, trifluoroethanol; TOCSY, total correlation spectroscopy

## ■ REFERENCES

- (1) Drider, D.; Rebuffat, S., Eds. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: from Genes to Applications*; Springer Science & Business Media: New York, 2011.
- (2) O'Connor, P. M.; Ross, R. P.; Hill, C.; Cotter, P. D. Antimicrobial antagonists against food pathogens: a bacteriocin perspective. *Curr. Opin. Food Sci.* **2015**, *2*, 51–57.
- (3) Borrero, J.; Jiménez, J. J.; Gútiérrez, L.; Herranz, C.; Cintas, L. M.; Hernández, P. E. Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* **2011**, *156*, 76–86.

- (4) Jiménez, J. J.; Borrero, J.; Diep, D. B.; Gútiérrez, L.; Nes, I. F.; Herranz, C.; Cintas, L. M.; Hernández, P. E. Cloning, production, and functional expression of the bacteriocin sakacin A (SakA) and two SakA-derived chimeras in lactic acid bacteria (LAB) and the yeasts *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *40*, 977–993.
- (5) Arbulu, S.; Jiménez, J. J.; Gútiérrez, L.; Cintas, L. M.; Herranz, C.; Hernández, P. E. Cloning and expression of synthetic genes encoding the broad antimicrobial spectrum bacteriocins SRCAM 602, OR-7, E-760, and L-1077, by recombinant *Pichia pastoris*. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, e767183.
- (6) Nes, I. F.; Diep, D. B.; Holo, H. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 1189–1198.
- (7) Cotter, P. D.; Hill, C.; Ross, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 777–788.
- (8) Drider, D.; Fimland, G.; Héchar, Y.; McMullen, L. M.; Prévost, H. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *70*, 564–582.
- (9) Fregeau Gallagher, N. L.; Sailer, M.; Niemczura, W. P.; Nakashima, T. T.; Stiles, M. E.; Vederas, J. C. Three-dimensional structure of leucocin A in trifluoroethanol and dodecylphosphocholine micelles: spatial location of residues critical for biological activity in type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry* **1997**, *36*, 15062–15072.
- (10) Nissen-Meyer, J.; Rogne, P.; Oppegård, C.; Haugen, H. S.; Kristiansen, P. E. Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2009**, *10*, 19–37.
- (11) Wang, Y.; Henz, M. E.; Gallagher, N. L.; Chai, S.; Gibbs, A. C.; Yan, L. Z.; Stiles, M. E.; Wishart, D. S.; Vederas, J. C. Solution structure of carnobacteriocin B2 and implications for structure-activity relationships among type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry* **1999**, *38*, 15438–15447.
- (12) Uteng, M.; Hauge, H. H.; Markwick, P. R. L.; Fimland, G.; Mantzilas, D.; Nissen-Meyer, J.; Muhle-Goll, C. Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P and a sakacin P variant that is structurally stabilized by an inserted C-terminal disulfide bridge. *Biochemistry* **2003**, *42*, 11417–11426.
- (13) Haugen, H. S.; Fimland, G.; Nissen-Meyer, J.; Kristiansen, P. E. Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide curvacin A. *Biochemistry* **2005**, *44*, 16149–16157.
- (14) Lohans, C. T.; Towle, K. M.; Miskolzie, M.; McKay, R. T.; van Belkum, M. J.; McMullen, L. M.; Vederas, J. C. Solution structures of the linear leaderless bacteriocins enterocin 7A and 7B resemble carnocyclin A, a circular antimicrobial peptide. *Biochemistry* **2013**, *52*, 3987–3994.
- (15) De Man, J. C.; Rogosa, M.; Sharpe, E. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **1960**, *23*, 130–135.
- (16) Cintas, L. M.; Casaus, P.; Holo, H.; Hernandez, P. E.; Nes, I. F.; Håvarstein, L. S. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 1988–1994.
- (17) Morrow, J. A.; Segall, M. L.; Lund-Katz, S.; Phillips, M. C.; Knapp, M.; Rupp, B.; Weisgraber, K. H. Differences in stability among the human apolipoprotein E isoforms determined by the amino-terminal domain. *Biochemistry* **2000**, *39*, 11657–11666.
- (18) Delaglio, F.; Grzesiek, S.; Vuister, G. W.; Zhu, G.; Pfeifer, J.; Bax, A. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* **1995**, *6*, 277–293.
- (19) Johnson, B. A. Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules. *Methods Mol. Biol.* **2004**, *278*, 313–352.
- (20) Wider, G.; Macura, S.; Kumar, A.; Ernst, R. R.; Wüthrich, K. Homonuclear two-dimensional  $^1\text{H}$  NMR of proteins. Experimental procedures. *J. Magn. Reson.* **1984**, *56*, 207–234.
- (21) Wüthrich, K. In *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; Wiley: New York, 1986.
- (22) Güntert, P. Automated NMR protein structure calculation with CYANA. *Methods Mol. Biol.* **2004**, *278*, 353–378.
- (23) The PyMOL Molecular Graphics System, version 1.7.4, by Schrödinger, LLC, 2010.
- (24) Dolinsky, T. J.; Nielsen, J. E.; McCammon, J. A.; Baker, N. A. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32* (Web Server), W665–W667.
- (25) González, C.; Langdon, G. M.; Bruix, M.; Gálvez, A.; Valdivia, E.; Maqueda, M.; Rico, M. Bacteriocin AS-48, a microbial cyclic polypeptide structurally and functionally related to mammalian NK-lysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 11221–11226.
- (26) Acedo, J. Z.; van Belkum, M. J.; Lohans, C. T.; McKay, R. T.; Miskolzie, M.; Vederas, J. C. Solution structure of acidocin B, a circular bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 2910–2918.
- (27) Ovchinnikov, K. V.; Kristiansen, P. E.; Uzelac, G.; Topisirovic, L.; Kojic, M.; Nissen-Meyer, J.; Nes, I. F.; Diep, D. B. Defining the structure and receptor binding domain of the leaderless bacteriocin LsbB. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 23838–23845.
- (28) Martin-Visscher, L. A.; Gong, X.; Duszyk, M.; Vederas, J. C. The three-dimensional structure of carnocyclin A reveals that many circular bacteriocins share a common structural motif. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 28674–28681.
- (29) Kawamoto, S.; Shima, J.; Sato, R.; Eguchi, T.; Ohmomo, S.; Shibato, J.; Horikoshi, N.; Takeshita, K.; Sameshima, T. Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 3830–3840.
- (30) Saavedra, L.; Minahk, C.; de Ruiz Holgado, A. P.; Sesma, F. Enhancement of the enterocin CRL35 activity by a synthetic peptide derived from the NH<sub>2</sub>-terminal sequence. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 2778–2781.
- (31) Feng, G.; Guron, G. K. P.; Churey, J. J.; Worobo, R. W. Characterization of mundticin L, a class IIa anti-*Listeria* bacteriocin from *Enterococcus mundtii* CUGF08. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 5708–5713.
- (32) Birri, D. J.; Brede, D. A.; Forberg, T.; Holo, H.; Nes, I. F. Molecular and genetic characterization of a novel bacteriocin locus in *Enterococcus avium* isolates from infants. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 483–492.
- (33) Salvucci, E.; Saavedra, L.; Hebert, E. M.; Haro, C.; Sesma, F. Enterocin CRL35 inhibits *Listeria monocytogenes* in a murine model. *Foodborne Pathog. Dis.* **2012**, *9*, 68–74.
- (34) Johnsen, L.; Fimland, G.; Nissen-Meyer, J. The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 9243–9250.
- (35) Fimland, G.; Eijsink, V. G. H.; Nissen-Meyer, J. Mutational analysis of the role of tryptophan residues in an antimicrobial peptide. *Biochemistry* **2002**, *41*, 9508–9515.
- (36) Kaur, K.; Andrew, L. C.; Wishart, D. S.; Vederas, J. C. Dynamic relationships among type IIa bacteriocins: temperature effects on antimicrobial activity and on structure of the C-terminal amphipathic alpha helix as a receptor-binding region. *Biochemistry* **2004**, *43*, 9009–9020.
- (37) Fimland, G.; Johnsen, L.; Dalhus, B.; Nissen-Meyer, J. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *J. Pept. Sci.* **2005**, *11*, 688–696.
- (38) Diep, D. B.; Skaugen, M.; Salehian, Z.; Holo, H.; Nes, I. F. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 2384–2389.
- (39) Kjos, M.; Salehian, Z.; Nes, I. F.; Diep, D. B. An extracellular loop of the mannose phosphotransferase system component IIC is responsible for specific targeting by class IIa bacteriocins. *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 5906–5913.

- (40) Kjos, M.; Nes, I. F.; Diep, D. B. Mechanisms of resistance to bacteriocins targeting the mannose phosphotransferase system. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 3335–3342.
- (41) Gabrielsen, C.; Brede, D. A.; Hernández, P. E.; Nes, I. F.; Diep, D. B. The maltose ABC transporter in *Lactococcus lactis* facilitates high-level sensitivity to the circular bacteriocin garvicin ML. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 2908–2915.
- (42) Uzelac, G.; Kojic, M.; Lozo, J.; Aleksandrak-Piekarczyk, T.; Gabrielsen, C.; Kristensen, T.; Nes, I. F.; Diep, D. B.; Topisirovic, L. A Zn-dependent metallopeptidase is responsible for sensitivity to LsbB, a class II leaderless bacteriocin of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMN1-S. *J. Bacteriol.* **2013**, *195*, 5614–5621.
- (43) Derksen, D. J.; Boudreau, M. A.; Vederas, J. C. Hydrophobic interactions as substitutes for a conserved disulfide linkage in the type IIa bacteriocins, leucocin A and pediocin PA-1. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1898–1901.
- (44) Sit, C. S.; Lohans, C. T.; van Belkum, M. J.; Campbell, C. D.; Miskolzie, M.; Vederas, J. C. Substitution of a conserved disulfide in the type IIa bacteriocin, leucocin A, with L-leucine and L-serine residues: effects on activity and three-dimensional structure. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 35–38.
- (45) Johnsen, L.; Fimland, G.; Mantzilas, D.; Nissen-Meyer, J. Structure-function analysis of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins: C-terminal parts of immunity proteins are involved in specific recognition of cognate bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 2647–2652.
- (46) Etayash, H.; Norman, L.; Thundat, T.; Kaur, K. Peptide-bacteria interactions using engineered surface-immobilized peptides from class IIa bacteriocins. *Langmuir* **2013**, *29*, 4048–4056.



## Supporting information

### Solution Structure of Enterocin HF, an Antilisterial Bacteriocin

#### Produced by *Enterococcus faecium* M3K31

Sara Arbulu<sup>§¶</sup>, Christopher T. Lohans<sup>‡¶</sup>, Marco J. van Belkum<sup>‡</sup>, Luis M. Cintas<sup>§</sup>,  
Carmen Herranz<sup>§</sup>, John C. Vederas<sup>‡\*</sup>, and Pablo E. Hernández<sup>§\*</sup>

<sup>§</sup>Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Avenida Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Spain

<sup>‡</sup>Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada T6G 2G2

#### AUTHOR INFORMATION

<sup>¶</sup> These authors contributed equally.

##### Submission author:

\* E-mail: ehernan@vet.ucm.es

##### Authors to whom inquiries should be addressed:

\* E-mail: ehernan@vet.ucm.es

\* E-mail: john.vederas@ualberta.ca

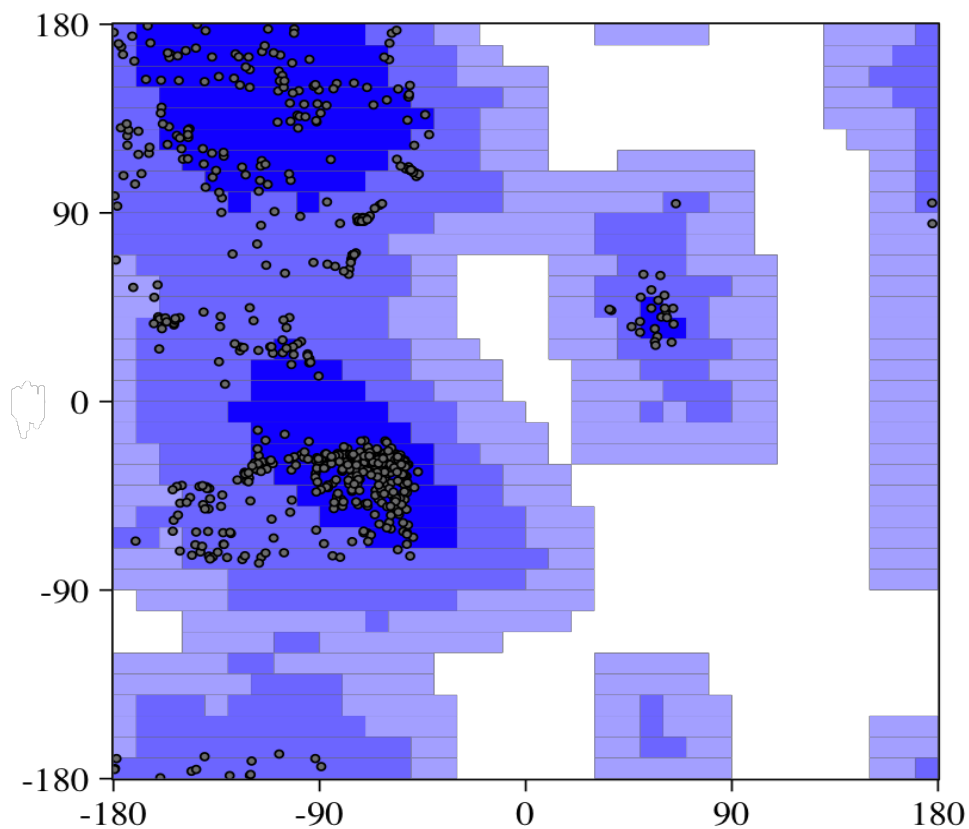
### **Supporting information contents**

Enterocin HF chemical shifts assignments	S1
Ramachandran plot for enterocin HF generated by CYANA 2.1.	S2
TOCSY and NOESY fingerprint of enterocin HF NMR spectra	S3
Backbone variability of the beta-sheet domain of enterocin HF	S4

Table S1. Enterocin HF chemical shifts

aa	HN	H $\alpha$	H $\beta$	Others
<b>Lys 1</b>		3.96	1.85, 1.81	$\gamma$ CH2 1.30, 1.22, $\delta$ CH2 1.67, $\epsilon$ CH2 2.93
<b>Tyr 2</b>	8.59		3.02, 2.94	$\delta$ CH 7.16, 7.16 $\epsilon$ CH 6.81, 6.81
<b>Tyr 3</b>	8.28	4.53	3.09, 2.75	$\delta$ CH 7.10, 7.11, $\epsilon$ CH 6.79, 7.11
<b>Gly 4</b>	6.96	4.04, 3.75		
<b>Asn 5</b>	8.35	4.70	2.87	$\delta$ NH2 7.44, 6.74
<b>Gly 6</b>	8.36	4.04, 3.84		
<b>Val 7</b>	7.77	4.43	2.06	$\gamma$ CH3 0.89
<b>Ser 8</b>	8.55	4.92	3.83, 3.83	
<b>Cys 9</b>	8.60	5.41	3.06	
<b>Asn 10</b>	8.90	4.83	3.29, 2.98	$\delta$ NH2 7.55, 6.65
<b>Lys 11</b>	8.17	4.21	1.91, 1.85	$\gamma$ CH2 1.55, $\delta$ CH2 1.76, $\epsilon$ CH2 3.05
<b>Lys 12</b>	8.26	4.34	1.97, 1.85	$\gamma$ CH2 1.50, $\delta$ CH2 1.72, $\epsilon$ CH2 3.01
<b>Gly 13</b>	7.96	4.44, 3.93		
<b>Cys 14</b>	8.30	5.45	3.01, 2.94	
<b>Ser 15</b>	8.85	4.63	3.88, 3.81	
<b>Val 16</b>	7.99	4.24	1.64	$\gamma$ CH3 0.76, 0.44
<b>Asp 17</b>	8.40		2.92, 2.68	
<b>Trp 18</b>	8.01	4.49	3.25, 3.39	$\delta_1$ CH 7.30, $\epsilon_1$ NH 9.86, $\zeta_2$ CH 7.45, $\eta_2$ CH 7.19, $\zeta_3$ CH 7.08, $\epsilon_3$ CH 7.55
<b>Gly 19</b>	8.33	3.81, 3.90		
<b>Lys 20</b>	7.70	4.26	1.83, 1.88	$\gamma$ CH2 1.51, 1.42, $\delta$ CH2 1.70, $\epsilon$ CH2 2.99
<b>Ala 21</b>	7.99	4.21	1.46	
<b>Ile 22</b>	7.97	4.03	1.91	$\gamma$ CH3 0.92, $\gamma$ CH2 1.56, 1.28, $\delta$ CH3 0.88
<b>Gly 23</b>	7.91	3.93		
<b>Ile 24</b>	7.76	4.06	1.97	$\gamma$ CH3 0.94, $\gamma$ CH2 1.63, 1.19, $\delta$ CH3 0.87
<b>Ile 25</b>	8.06	3.99	1.92	$\gamma$ CH3 0.95, $\gamma$ CH2 1.64, 1.20, $\delta$ CH3 0.87
<b>Gly 26</b>	8.36	3.95, 3.94		
<b>Asn 27</b>	8.06	4.67	2.86	$\delta$ NH2 7.51, 6.74
<b>Asn 28</b>	8.29	4.63	2.85	$\delta$ NH2 7.49, 6.76
<b>Ala 29</b>	8.45	4.22	1.50	
<b>Ala 30</b>	8.08	4.18	1.49	
<b>Ala 31</b>	7.97	4.18	1.47	
<b>Asn 32</b>	8.06	4.61	2.83	$\delta$ NH2 7.39, 6.82
<b>Leu 33</b>	8.17	4.32	1.85, 1.76	$\gamma$ CH 1.66, $\delta$ CH3 0.93, 0.90
<b>Thr 34</b>	7.99	4.35	4.36	$\gamma$ CH3 1.30
<b>Thr 35</b>	7.83	4.41		$\gamma$ CH3 1.28
<b>Gly 36</b>	8.17	3.99		
<b>Gly 37</b>	8.32	4.01	3.93	
<b>Lys 38</b>				
<b>Ala 39</b>	8.13	4.32	1.38	
<b>Gly 40</b>	8.16	3.99, 3.93		
<b>Trp 41</b>	7.93	4.66	3.31	$\delta_1$ CH 7.25, $\epsilon_1$ NH 10.02, $\zeta_2$ CH 7.749, $\eta_2$ CH 7.242, $\zeta_3$ CH 7.16, $\epsilon_3$ CH 7.63
<b>Lys 42</b>				
<b>Gly 43</b>	7.10	3.74, 3.63		

Ramachandran plot



62.8% in most favored regions  
35.3% in additionally allowed regions  
1.9% in generously allowed regions  
0.0% in disallowed regions

Figure S2. Ramachandran plot for enterocin HF generated by CYANA 2.1.

## TOCSY and NOESY fingerprint of enterocin HF NMR spectra

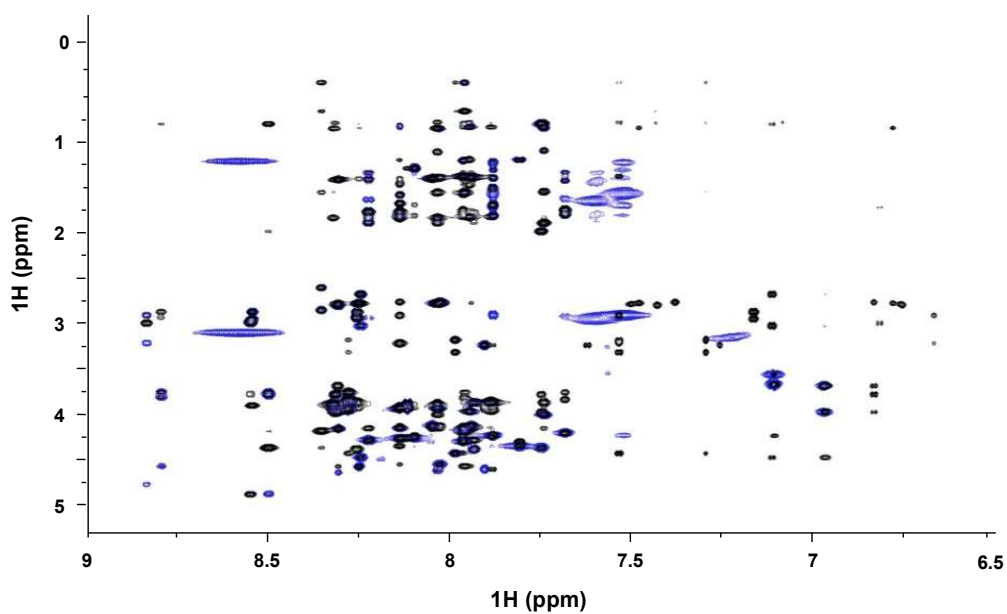


Figure S3. TOCSY (black) and NOESY (blue) fingerprint of the NMR spectra of enterocin HF.

## Backbone variability of the beta-sheet domain of enterocin HF

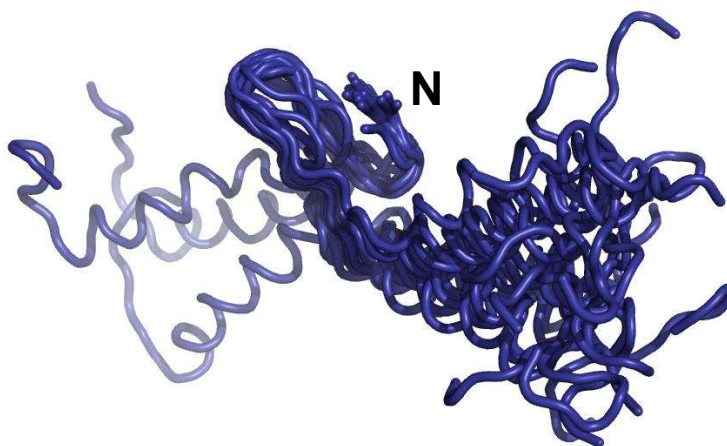


Figure S4. Overlay of beta-sheet of the 20 structures calculated by CYANA. N-terminal end indicated by N.

# CAPÍTULO *CHAPTER*

VI

**DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA GENÓMICA DE  
*Enterococcus faecium* M3K31, PRODUCTORA DE  
BACTERIOCINAS Y AISLADA DE BUITRES LEONADOS  
(*Gyps fulvus* subsp. *fulvus*)**

---

***DRAFT GENOME SEQUENCE OF THE BACTERIOCIN-  
PRODUCING STRAIN *Enterococcus faecium* M3K31, ISOLATED  
FROM GRIFFON VULTURES (*Gyps fulvus* subsp. *fulvus*)***





## Draft Genome Sequence of the Bacteriocin-Producing Strain *Enterococcus faecium* M3K31, Isolated from Griffon Vultures (*Gyps fulvus* subsp. *fulvus*)

Sara Arbulu,<sup>a</sup> Cyril Frantzen,<sup>b</sup> Christopher T. Lohans,<sup>c</sup> Luis M. Cintas,<sup>a</sup> Carmen Herranz,<sup>a</sup> Helge Holo,<sup>b</sup> Dzung B. Diep,<sup>b</sup> John C. Vederas,<sup>c</sup> Pablo E. Hernández<sup>a</sup>

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain<sup>a</sup>; Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science, Norwegian University of Life Sciences, Ås, Norway<sup>b</sup>; Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada<sup>c</sup>

***Enterococcus faecium* M3K31 is a bacteriocinogenic lactic acid bacterium (LAB) isolated from griffon vulture (*Gyps fulvus* subsp. *fulvus*) feces. The draft genome sequence of this strain provides genetic data that support its biotechnological potential.**

Received 13 January 2016 Accepted 14 January 2016 Published 24 March 2016

**Citation** Arbulu S, Frantzen C, Lohans CT, Cintas LM, Herranz C, Holo H, Diep DB, Vederas JC, Hernández PE. 2016. Draft genome sequence of the bacteriocin-producing strain *Enterococcus faecium* M3K31, isolated from griffon vultures (*Gyps fulvus* subsp. *fulvus*). Genome Announc 4(2):e00055-16. doi:10.1128/genomeA.00055-16.

**Copyright** © 2016 Arbulu et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Pablo E. Hernández, ehernan@vet.ucm.es.

The enterococci are a diverse group of Gram-positive gastrointestinal (GI) tract colonizers recognized as microorganisms of applied, regulatory, and biotechnological interest (1–3). *Enterococcus faecium* M3K31 is a bacteriocinogenic lactic acid bacterium (LAB) isolated from the feces of griffon vultures (*Gyps fulvus* subsp. *fulvus*), with high antimicrobial activity against *Listeria* spp., and it is the producer of the bacteriocin enterocin HF (EntHF) (4). Genomic DNA from *E. faecium* M3K31 was purified using the DNeasy blood and tissue kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and sequenced by using a MiSeq platform (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) at the DNA High-Throughput Sequencing and Genotypic Unit of the University of Illinois at Urbana-Champaign (IL). The shotgun DNaseq library was prepared with the Kapa library preparation kit (Kapa Biosystems, Inc., Wilmington, MA). The library was quantitated by quantitative PCR (qPCR) and sequenced for 251 cycles using a MiSeq sequencing kit version 2. Reads were quality filtered using Neson (version 0.130; P. Harrison, 2015) and *de novo* assembled using SPAdes (version 3.5) (5). Contigs <1,000 bp and with coverage <5-fold were removed. Coding DNA sequences (CDSs) were predicted and annotated using the RAST (<http://rast.nmpdr.org/>) server (6).

The draft genome of *E. faecium* M3K31 consists of 70 contigs, for a total of 2,722,557 bp, with a G+C content of 38.1%. The largest contig was 245,388 bp, and the smallest contig was 1,062 bp. The total number of CDSs was 2,687, and the number of RNAs was 79. *In silico* analysis of the draft genome sequence with the BAGEL3 software (<http://bagel2.molgenrug.nl/>) (7) confirmed the presence of the EntHF biosynthetic cluster (GenBank accession numbers P86183 and KJ442693), the enterocin P structural and immunity genes (8), and the gene encoding a bacteriocin (GenBank accession no. ELB21426), which resembles (85% identity) a putative peptide named SRCAM 602 (GenBank accession no. P86393) proposed to be produced (9) but not encoded by *Paenibacillus polymyxa* NRRL-30509 (10). The structural genes related to each bacteriocin were found in three different contigs.

The rifampin resistance (*rpoB*) gene was detected, but no other relevant antibiotic resistance genes or genes associated with virulence factors related to invasiveness and disease severity were identified (11). Screening of the whole genome of *E. faecium* M3K31 confirmed the absence of the following virulence or virulence-associated factors: insertion sequence (IS16), the enterococcal surface protein (*esp*), and the putative glycosyl hydrolase (*hyl*) virulence genes, hence meeting the European Food Safety Authority (EFSA) requirements for the potential safe use of this enterococcal strain as a feed additive (12). One clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) array, considered a barrier to foreign DNA uptake, was identified using CRISPRfinder (13). The availability of this draft genome may strengthen the value of the bacteriocin-producing *E. faecium* M3K31 as a potentially useful natural food preservative and therapeutic for human and veterinary applications, and as a potential probiotic for use in animal nutrition.

**Nucleotide sequence accession numbers.** This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession no. LAXK00000000. The version described in this paper is the first version, LAXK01000000.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (Spain) for the Fellowship (FPI) awarded to S. Arbulu.

### FUNDING INFORMATION

This work was supported by funding from project AGL2012-34829 from the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), by grant S2013/ABI-2747 from the Comunidad de Madrid (CAM), by the EEA grant NILS Science and Sustainability Coordinated Mobility of Researchers (017-ABEL-CM-2013) (Spain), and by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NRSC) and the Canada Research Chair in Bioinorganic and Medicinal Chemistry (Canada).



Arbulu et al.

## REFERENCES

1. Franz CM, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, Gálvez A. 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int J Food Microbiol* 151:125–140. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014>.
2. Palmer KL, Godfrey P, Griggs A, Kos VN, Zucker J, Desjardins C, Cerqueira G, Gevers D, Walker S, Wortman J, Feldgarden M, Haas B, Birren B, Gilmore MS. 2012. Comparative genomics of enterococci: variation in *Enterococcus faecalis*, clade structure in *E. faecium*, and defining characteristics of *E. gallinarum* and *E. casseliflavus*. *mBio* 3(1):e00318-11. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00318-11>.
3. Nes IF, Diep DB, Ike Y. 2014. Enterococcal bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to niche control, p 1–24. In Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N (ed), *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, MA.
4. Arbulu S, Lohans CT, van Belkum MJ, Cintas LM, Herranz C, Vederas JC, Hernández PE. 2015. Solution structure of enterocin HF, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* M3K31. *J Agric Food Chem* 63:10689–10695. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03882>.
5. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Pribelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19:455–477. <http://dx.doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
6. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9:75. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.
7. Van Heel AJ, de Jong A, Montalbán-López M, Kok J, Kuipers OP. 2013. BAGEL3: automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-)bactericidal posttranslationally modified peptides. *Nucleic Acids Res* 41:W448–W453. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt391>.
8. Cintas LM, Casaus P, Håvarstein LS, Hernández PE, Nes IF. 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel *sec*-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl Environ Microbiol* 63:4321–4330.
9. Svetoch EA, Stern NJ, Eruslanov BV, Kovalev YN, Volodina LI, Pereilygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Pokhilenko VD, Borzenkov VN, Levchuk VP, Svetoch OE, Kudriatseva TY. 2005. Isolation of *Bacillus circulans* and *Paenibacillus polymyxa* strains inhibitory to *Campylobacter jejuni* and characterization of associated bacteriocins. *J Food Prot* 68:11–17.
10. Lohans CT, Huang Z, van Belkum MJ, Giroud M, Sit CS, Steels EM, Zheng J, Whittall RM, McMullen LM, Vederas JC. 2012. Structural characterization of the highly cyclized lantibiotic paenicidin A via a partial desulfurization/reduction strategy. *J Am Chem Soc* 134:19540–19543. <http://dx.doi.org/10.1021/ja3089229>.
11. Sánchez J, Basanta A, Gómez-Sala B, Herranz C, Cintas LM, Hernández PE. 2007. Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int J Food Microbiol* 117:295–305. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.04.012>.
12. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). 2012. Guidance on the safety assessment of *Enterococcus faecium* in animal nutrition. *EFSA J* 10:2682. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2682>.
13. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. 2007. CRISPRFinder: a Web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res* 35:W52–W57. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm360>.

# CAPÍTULO *CHAPTER*

VII

**CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES SINTÉTICOS QUE  
CODIFICAN BACTERIOCINAS DE LA CLASE IIa  
NATIVAS, BACTERIOCINAS HÍBRIDAS Y  
BACTERIOCINAS QUIMERAS, POR *Pichia pastoris***

---

***CLONING AND EXPRESSION OF SYNTHETIC GENES  
ENCODING NATIVE, HYBRID AND BACTERIOCIN-DERIVED  
CHIMERAS FROM MATURE CLASS IIA BACTERIOCINS, BY  
RECOMBINANT *Pichia pastoris****

**Manuscrito en preparación para su envío a Microbial Cell Factories**



## VII.1. ABSTRACT

Synthetic genes designed from (a), the native amino acid sequence of the class IIa bacteriocins enterocin HF (EntHF) and enterocin CRL35 (EntCRL35), (b) from hybrid bacteriocins derived from the fusion of enterocin A (EntA) to itself (EntA), EntHF and EntCRL35 through a tri-glycine peptide linker, and (c) from bacteriocin-derived chimeras derived from fusion of the N-terminal region of EntA and EntP to the C-terminal end of EntHF and EntCRL35, were cloned into the protein expression vector pPICZαA for transformation into *P. pastoris* X-33. The pP-αhSUMO3 protein expression vector was also used for cloning of *entHF* and *entCRL35* for expression of hSUMO3-fused bacteriocins by *P. pastoris*. However, none of the *P. pastoris* X33-derived recombinants encoding native and hybrid bacteriocins, showed antimicrobial activity in their supernatants. Only recombinant *P. pastoris* expressing the bacteriocin-derived chimeras but not bacteriocins fused to hSUMO3, displayed antimicrobial activity. The *P. pastoris* X-33 derivative, producer of the EntP::EntHF chimera, showed the largest antimicrobial activity in supernatants and in the multistep-chromatography purified fractions. MALDI-TOF MS analysis of purified fractions with antimicrobial activity from yeasts producers of native, hybrid, bacteriocin-derived chimeras and hSUMO3-fused bacteriocins, did not reveal the presence in the samples of peptides with the expected molecular mass of the bacteriocins being evaluated. However, MRM-ESI-LC-MS/MS (QTRAP) analysis revealed the presence of the expected bacteriocins in the purified fractions. The results obtained suggest that the N-terminal region of EntA and EntP drives processing and secretion of the biologically active EntA::EntHF chimera and other bacteriocin-derived chimeras, produced by *P. pastoris*. Comparison of the antimicrobial activity of the EntP::EntHF chimera respect to the synthetic EntP::EntHF<sub>synth</sub>, suggest that the recombinant bacteriocin chimera shows a higher specific antimicrobial activity than its synthetic counterpart against several *Listeria* spp., including *L. monocytogenes*. However, production of biologically active bacteriocin-derived chimeras seems to be lower than expected and their purification to homogeneity the subject of further refinements.

**Keywords:** Synthetic genes, bacteriocins, hybrid bacteriocins, bacteriocin-derived chimeras, pPICZαA expression vectors, SUMO expression vectors, *Pichia pastoris*, Multiple reaction monitoring (MRM), homology modeling

## VII.2. INTRODUCTION

Bacteriocins are ribosomally synthesized antimicrobial peptides produced by bacteria and very active at pico- to nanomolar concentrations. Furthermore, those produced by lactic acid bacteria (LAB) attract considerable interest primarily as natural and nontoxic food preservatives (O'Connor et al., 2015), but also for their potential application as therapeutic antimicrobial agents for human and veterinary applications and in the animal production field (Dridger and Rebuffat, 2011; Cotter et al., 2013; Arbulu et al., 2015a).

Most LAB bacteriocins are synthesized as biologically inactive precursors or prepeptides containing an N-terminal extension that is cleaved off during export to generate their

biologically active or mature form. The mature peptides are generally classified into two main classes: class I or lantibiotics, with lanthionine-containing post-translationally modified amino acid residues and class II bacteriocins with unmodified amino acid residues. The class II bacteriocins may be further subdivided into the pediocin-like (class IIa) bacteriocins, the two-peptide (class IIb) bacteriocins, the cyclic (class IIc) bacteriocins, and the non-pediocin-like one peptide linear (class IId) bacteriocins (Cotter et al., 2005; Nes et al., 2007). However, additional subgroups have been suggested for leaderless peptides, circular bacteriocins, linear peptides derived from large proteins, and the glycosylated bacteriocins (Kjos et al., 2011). The class IIa bacteriocins produced by LAB usually display a high antilisterial activity and have been extensively studied.

Enterocin HF (EntHF) is a class IIa bacteriocin, produced by *E. faecium* M3K31 isolated from Griffon vultures (*Gyps fulvus* subsp. *fulvus*), with high antimicrobial activity against *Listeria* spp. and with a disulfide bond in the N-terminal region (C9-C14) and a tryptophan at position 41 of the molecule, showing strong sequence similarity with other class IIa bacteriocins (Arbulu et al., 2015a). In this context, mature EntHF is 91% identical to mundticin KS/enterocin CRL35 (Kawamoto et al., 2002; Saavedra et al., 2004) and 90% identical to mundticin L (Feng et al., 2009) and avicin A (Birri et al., 2010). All these bacteriocins display high antilisterial activity and enterocin CRL35 has even been postulated as a promising alternative agent for the *in vivo* prevention of *Listeria* spp. infections (Salvucci et al., 2012).

However, the production of large quantities of bacteriocins is still a remarkable tailback for their scientific and industrial development. The small quantity of peptides obtained from native producers and the high cost of large-scale peptide synthesis, drive the exploration of recombinant microbial systems for production of bacteriocins in larger amounts and with higher specific antimicrobial activity (Cintas et al., 2011; Borrero et al., 2012; Jiménez et al., 2015). Accordingly, we report in this study the cloning and expression of synthetic genes encoding native, hybrid and bacteriocin-derived chimeras from class IIa bacteriocins, by recombinant *Pichia pastoris*. Synthetic genes were designed from the known amino acid sequence of the class IIa bacteriocins EntHF (Arbulu et al., 2015a) and enterocin CRL35 (EntCRL35) (Saavedra et al., 2004). We also report the design of synthetic genes encoding hybrid bacteriocins derived from the bacteriocin enterocin A (EntA) (Casaus et al., 1997) fused to EntA (EntA::L::EntA), EntHF (EntA::L::EntHF) and EntCRL (EntA::L::CRL35), respectively, including the L (3 amino acid Gly-Gly-Gly) linker. Synthetic genes were also designed encoding the bacteriocin-derived chimeras EntA::EntHF and EntA::EntCRL35 and the enterocin P-derived (Cintas et al., 1997) chimeras EntP::EntHF and EntP::EntCRL35. Synthetic genes encoding native, hybrid and bacteriocin-derived chimeras with adapted codon usage for expression by *P. pastoris*, were cloned into the pPICZαA expression vector for evaluation of their expression by recombinant *P. pastoris* X-33. Synthetic genes, encoding native EntHF and EntCRL35, were also cloned into the pP-αhSUMO3 expression vector for expression by recombinant *P. pastoris* X-33.

### VII.3. MATERIALS AND METHODS

#### VII.3.1. Microbial strains and plasmids

*Pediococcus damnosus* CECT4797 (Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, Spain) was grown in MRS broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) at 32°C. *Pichia pastoris* X-33 (Invitrogen S.A., Barcelona, Spain) was cultured in YPD medium (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) at 30°C with shaking (200-250 rpm). *Escherichia coli* JM109 (Promega, WI, USA) was grown in LB broth (Sigma-Aldrich) at 37°C with shaking (250 rpm). Zeocin (Invitrogen) was added when needed at concentrations of 25, 100 or 1,000 µg/mL.

#### VII.3.2 Basic genetic techniques and enzymes

The known amino acid sequences of mature EntHF, EntCRL35, EntA and EntP were used for design of synthetic genes encoding these native bacteriocins as well as the hybrid bacteriocins EntA::L::EntA, EntA::L::EntHF, EntA::L::EntCRL35, and the bacteriocin-derived chimeras EntA::EntHF, EntA::EntCRL35, EntP::EntHF and EntP::EntCRL35. The amino acid and codon adapted nucleotide sequence for expression of these synthetic genes by *P. pastoris*, are shown in Table 1. All synthetic genes, encoded in pMA- or pMAT-derived (GeneArt® Life Technologies, Paisley, UK) plasmids (Table 2), contained a 5'-nucleotide appendix including the *XhoI* restriction site (GAATTCTCGAGAAAAGA) and a 3'-nucleotide appendix including the termination codon (TAA/TAAGGG) and the *NotI* restriction site (TAAGGGAAGGTCGAAGCGGCCGCAACGAT. GeneArt® was the supplier of synthetic genes (Life Technologies) and New England BioLabs, Ipswich, MA, (USA) the supplier of the DNA restriction enzymes. Ligations were performed with the T4 DNA ligase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). *E. coli* JM109 cells were transformed as described by the supplier and competent *P. pastoris* X-33 cells were also obtained as recommended by the supplier. Electrocompetent cells were transformed with a Gene Pulser™ and Pulse Controller apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

#### VII.3.3 PCR amplification and nucleotide sequencing

Oligonucleotide primers were obtained from Sigma-Genosys Ltd., Cambridge, (UK). PCR amplifications were performed in 50 µL reaction mixtures containing 1 µL of purified DNA, 70 pmol of each primer and 1 U of Velocity DNA Polymerase (Bioline, London, UK) in a DNA thermal cycler Techgene (Techne, Cambridge, UK). The PCR-generated fragments were purified by a NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co., Düren, Germany) for cloning and nucleotide sequencing. When needed, nucleotide sequencing of the purified PCR products was performed using the ABI PRISM® BigDye™ Terminator cycle sequence reaction kit and the automatic DNA sequencer ABI PRISM, model 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), at the Unidad de Genómica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Madrid, Spain.

Table 1. Amino acid and nucleotide sequence sequence of the native, hybrid and bacteriocin-derived chimeras included in this study

Bacteriocin		Length (aa)
<b>EntHF</b>		
Amino acid sequence	KYYGNGVSCNKKGCSVDWGKAIGIIGNNAAANLTTGGKAGWKG	43
<i>P. pastoris</i> codon usage sequence	aagtactacggtaacgggtgtttcctgtaacaagaaggggtgttccggtgactggggtaaggctattggtatcatcggtaacaa cgctgctgctaacttgactactggtggtaaggctggttggaaaggt	
<b>EntCRL35</b>		
Amino acid sequence	KYYGNGVSCNKKGCSVDWGKAIGIIGNNSAANLATGGAAGWKS	43
<i>P. pastoris</i> codon usage sequence	aagtactacggtaacgggtgtttcctgtaacaagaaggggtgttccggtgactggggtaaggctattggtatcatcggtaacaa ctccgctgctaactgggctactggtgggtgctgctggttggaaatct	
<b>EntA</b>		
Amino acid sequence	TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDWAKATTTCIAGMSIGGFLGGAIPGKC	47
<i>P. pastoris</i> codon usage sequence	actactcactccggtaagtactacggtaacgggtgtttactgtactaagaacaagtgtactgttgactgggctaaggctactac ttgtatcgctggatgtccatcggtgggttttttgggtgggtgctatcccaggtaaagtgt	
<b>EntP</b>		
Amino acid sequence	ATRSYNGVYCNNSKCWVNWGEAKENIAGIVISGWASGLAGMGH	44
<i>P. pastoris</i> codon usage sequence	actagatcctacggtaacgggtgtttactgtaacaactccaagtgttgggttaactggggtaaggctatcggtatcatcggtaac acgctgctgctaacttgactactggtggtaaggctggttggaaaggttaaggt	
<b>EntA::L::EntA</b>		
Amino acid sequence	TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDWAKATTTCIAGMSIGGFLGGAIPGKC <u>GGGT</u> TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDWAKATTTCIAGM SIGGFLGGAIPGKC	97
<i>P. pastoris</i> codon usage sequence	actactcactccggtaagtactacggtaacgggtgtttactgtactaagaacaagtgtactgttgactgggctaaggctactac ttgtatcgctggatgtccatcggtgggttttttgggtgggtgctatcccaggtaaagtgt <u>gggtgggtgggt</u> actactcactccggtaagtactacggtaacgggtgtttactgtactaagaacaagtgtactgttgactgggctaaggctactac ttgtatcgctggatgtccatcggtgggttttttgggtgggtgctatcccaggtaaagtgt	

### EntA::L::EntHF

Amino acid sequence	TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDWAKATTTCIAGMSIGGFLGGAI <b>PGKC</b> <u>GGG</u> KYYGNGVSCNKKGCSVDWGKAIGIIGNNAAANL TTGGKAGWKG	93
<i>P. pastoris</i> codon usage sequence	actactcactccggttaagtactacggttaacggtgtttactgtactaagaacaagtgtactgttgactgggctaaggctactac ttgtatcgctgggtatgtccatcggtggttttttgggtggtgctatcccaggtaagtgtggtggtggtactactcactccggt agtactacggttaacggtgtttactgtactaagaacaagtgtactgttgactgggtaaggctatcggtatcatcggttaacaac gctgctgctaacttgactactggtggttaaggctggttgaagggt	

### EntA::L::EntCRL35

Amino acid sequence	TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDWAKATTTCIAGMSIGGFLGGAI <b>PGKC</b> <u>GGG</u> KYYGNGVSCNKKGCSVDWGKAIGIIGNNSAANL ATGGAAGWKS	93
<i>P. pastoris</i> codon usage sequence	actactcactccggttaagtactacggttaacggtgtttactgtactaagaacaagtgtactgttgactgggctaaggctactac ttgtatcgctgggtatgtccatcggtggttttttgggtggtgctatcccaggtaagtgtggtggtggttaagtactacggttaacg gtgtttcctgtaacaagaagggtgttccgttgactgggtaaggctattggtatcatcggttaacaactccgctgctaacttg gctactggtggtgctgctggttggaaatct	

### EntA::EntHF

Amino acid sequence	<b>TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDW</b> GKAIGIIGNNAAANLTTGGKAGWKG	48
<i>P. pastoris</i> codon usage sequence	actactcactccggttaagtactacggttaacggtgtttactgtactaagaacaagtgtactgttgactggggtaaggctatcgg tatcatcggttaacaacgctgctgctaacttgactactggtggttaaggctggttgaagggt	

### EntA::EntCRL35

Amino acid sequence	<b>TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDW</b> GKAIGIIGNNSAANLATGGAAGWKS	48
<i>P. pastoris</i> codon usage sequence	actactcactccggttaagtactacggttaacggtgtttactgtactaagaacaagtgtactgttgactggggtaaggctatcgg tatcatcggttaacaactccgctgctaacttggtactggtggtgctgctggttggaaatct	

### EntP::EntHF

Amino acid sequence	<b>ATRSYGNNGVYCNNSK</b> <b>CW</b> GKAIGIIGNNAAANLTTGGKAGWKG	42
<i>P. pastoris</i> codon usage sequence	actagatcctacggttaacggtgtttactgttaacaactccaagtgttgggttaactgggtaaggctatcggtatcatcggtta caacgctgctgctaactgctgctaacttgactactggtggttaaggctggttgaagggttaagggt	

### EntP::EntCRL35

Amino acid sequence	<b>ATRSYGNNGVYCNNSK</b> <b>CW</b> GKAIGIIGNNSAANLATGGAAGWKS	42
---------------------	---	----



<i>P. pastoris</i> codon usage	actagatcctacggtaacggtgtttactgtaacaactccaagtgttgggttaactggggtaaggctatcggtatcatcggtaa
sequence	caactccgctgctaacttggctactggtggtgctgctggttggaatct

---

\* Underlined, the tri-Gly linker (GGG).

- In bold, the N-terminal region of EntA and EntP fused to EntHF and EntCRL35.

**Table 2. Plasmids used in this study**

Plasmids	Description <sup>a</sup>	Source and/or reference
pPICZαA	Zeo <sup>r</sup> ; integrative plasmid carrying the secretion signal sequence from the <i>S. cerevisiae</i> α-factor prepropeptide and functional sites for integration at the 5'-AOX1 locus of <i>P. pastoris</i> X-33	Invitrogen Life Technologies
pP-αhSUMO3	Zeo <sup>r</sup> ; integrative plasmid carrying the hSUMO3 protein tag, the secretion signal sequence from the <i>S. cerevisiae</i> α-factor prepropeptide and the functional sites for integration at the 5'-AOX1 locus of <i>P. pastoris</i> X-33	Life Sensors, Inc.
pMAEntA	Amp <sup>r</sup> ; pMA plasmid carrying the <i>entA</i> synthetic gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	GeneArt <sup>®</sup> Life Technologies
pMATEntP	Amp <sup>r</sup> ; pMAT plasmid carrying the <i>entP</i> synthetic gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	GeneArt <sup>®</sup> Life Technologies
pMATEntHF	Amp <sup>r</sup> ; pMAT plasmid carrying the <i>entHF</i> synthetic gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	GeneArt <sup>®</sup> Life Technologies
pMATEntCRL35	Amp <sup>r</sup> ; pMAT plasmid carrying the <i>entCRL35</i> synthetic gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	GeneArt <sup>®</sup> Life Technologies
pMATEntA::EntHF	Amp <sup>r</sup> ; pMAT plasmid carrying the <i>entA::entHF</i> synthetic gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	GeneArt <sup>®</sup> Life Technologies
pMATEntA::EntCRL35	Amp <sup>r</sup> ; pMAT plasmid carrying the <i>entA::entCRL35</i> synthetic gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	GeneArt <sup>®</sup> Life Technologies
pMATEntP::EntHF	Amp <sup>r</sup> ; pMAT plasmid carrying the <i>entP::entHF</i> synthetic gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	GeneArt <sup>®</sup> Life Technologies
pMATEntP::EntCRL35	Amp <sup>r</sup> ; pMAT plasmid carrying the <i>entP::entCRL35</i> synthetic gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	GeneArt <sup>®</sup> Life Technologies
pEntA	pPICZαA derivative with the <i>entA</i> synthetic gene	This work
pEntP	pPICZαA derivative with the <i>entP</i> synthetic gene	This work

pEntHF	pPICZαA derivative with the <i>entHF</i> synthetic gene	This work
pEntCRL35	pPICZαA derivative with the <i>entCRL35</i> synthetic gene	This work
pEntA::L::EntA	pPICZαA derivative with the <i>entA::L::entA</i> synthetic gene	This work
pEntA::L::EntHF	pPICZαA derivative with the <i>entA::L::entHF</i> synthetic gene	This work
pEntA::L::EntCRL35	pPICZαA derivative with the <i>entA::L::entCRL35</i> synthetic gene	This work
pEntA::EntHF	pPICZαA derivative with the <i>entA::entHF</i> synthetic gene	This work
pEntA::EntCRL35	pPICZαA derivative with the <i>entA::CRL35</i> synthetic gene	This work
pEntP::EntHF	pPICZαA derivative with the <i>entP::entHF</i> synthetic gene	This work
pEntP::EntCRL35	pPICZαA derivative with the <i>entP::entCRL35</i> synthetic gene	This work

<sup>a</sup> Amp<sup>r</sup>, ampicillin resistance; Zeo<sup>r</sup>, zeocin resistance.

### VIII.3.4 Heterologous expression by *P. pastoris*

#### VII.3.4.1 Cloning of synthetic genes encoding native, hybrid and bacteriocin-derived chimeras in the pPICZαA protein expression vector

The primers and inserts used for construction of the recombinant pPICZαA-derived plasmids are listed in Table 3. Nucleotide fragments were in frame with the *S. cerevisiae* α-factor secretion signal, without the Glu-Ala spacer adjacent to the Kex2 protease cleavage site, of the fused synthetic genes. Digestion of fragments with *XhoI*-*NotI* permitted ligation of the resulting R-fragments into pPICZαA, digested with the same enzymes. The construction of synthetic genes encoding the hybrid bacteriocins EntA::L::EntA, EntA::L::EntHF and EntA::L::EntCRL35, was performed by an overlapping polymerase chain reaction (PCR). Briefly, the PCR strategy used to fuse *entA* to *entHF* through a three amino acid Gly-Gly-Gly linker will be described. First, *entA* was amplified incorporating the *XhoI* restriction site and the Kex signal at the 5'-end. An overlapping fragment containing a flexible region (Gly-Gly-Gly) and the beginning of *entHF* gene was incorporated at the 3'-end (IT1-EntA-EntHF). Second, a IT2-*entA*-*entHF* fragment was amplified, with the *entHF* 5'-end, the stop codon (TAAGGG) and the *NotI* restriction site. Finally, the products IT1 and IT2 were used as templates to generate the construction IT3-EntA-EntHF, including the *entA* and *entHF* sequence encoding mature bacteriocins fused through a flexible peptide linker. All plasmids generated and used this study are shown in Table 2. Competent *E. coli* JM109 cells were used for cloning and vector propagation and the resulting transformants were confirmed by PCR amplification and sequencing of the inserts. Subsequently, the *SacI*-linearized vectors were

transformed into competent *P. pastoris* X-33 that, after growth on YPD agar supplemented with zeocin (100 and 1,000 µg/mL) and sorbitol (1 M), yielded the corresponding zeocin-resistant derivatives. PCR and DNA sequencing of the inserts confirmed presence of the cloned synthetic genes in the transformed cells. *P. pastoris* X-33 and *P. pastoris* X-33 (pPICZαA) were used as bacteriocin-negative controls, to discard the possibility that the antimicrobial activity of recombinant yeasts was due to metabolites other than bacteriocins.

#### VII.3.4.2 Antimicrobial activity of recombinant *P. pastoris* X-33-derived producers

The antimicrobial activity of individual *P. pastoris* X-33 transformants was screened by a streak-on-agar test (SOAT), as previously described (Jiménez et al., 2014). Briefly, 90 colonies of *P. pastoris* X-33 recombinants encoding EntHF, EntCRL35, EntA::L::EntA, EntA::L::EntHF, EntA::L::EntCRL35, EntA::EntHF, EntA::EntCRL35, and 120 colonies of *P. pastoris* X-33 recombinants encoding EntP::EntHF and EntP::EntCRL35, were streaked onto BMMY buffered methanol complex medium [1% yeast, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate (pH 6), 1.34% yeast nitrogen base (YNB) without amino acids,  $4 \times 10^{-5}$  % biotin, 0.5% methanol] agar and grown at 30°C during 0 to 96 h, to induce production of the bacteriocins. Pure methanol was added to a final concentration of 0.5% every 24 hours to maintain induction. After incubation of the plates, MRS soft-agar containing  $10^5$  cfu/mL of the indicator microorganism *P. damnosus* CECT4797 was added to the plates that were further incubated at 32°C for 24 h for visualization of halos of inhibition.

To evaluate growth of the recombinant yeasts and the antimicrobial activity of their supernatants, the *P. pastoris* X-33-derived bacteriocin producers were grown in the buffered glycerol complex medium BMGY [1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate (pH 6), 1.34% YNB without amino-acids,  $4 \times 10^{-5}$ % biotin, 1% glycerol] at 30°C, until an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of, approximately, 2 to 6 was reached. Cells were then harvested by centrifugation (5,000 x g at 4°C for 10 min), and resuspended to an OD<sub>600</sub> of 1 in the BMMY medium. The *P. pastoris* cultures were incubated at 30°C for 96 h with shaking (250 rpm). During growth, samples were collected periodically for determination of their OD<sub>600</sub> and the antimicrobial activity of their supernatants, by an agar well diffusion test (ADT) and a microtiter plate assay (MPA) (Cintas et al., 2000), using *P. damnosus* CECT4797 as the indicator microorganism. With the MPA, growth inhibition of the sensitive culture was measured spectrophotometrically at 620 nm with a microtitre Labsystems iEMS plate reader (Labsystems, Helsinki, Finland). One bacteriocin unit (BU) was defined as the reciprocal of the highest dilution of the bacteriocin causing 50% growth inhibition (50% of the turbidity of the control culture without bacteriocin).

#### VII.3.4.3 Purification of the antimicrobial activity of supernatants from recombinant *P. pastoris* X-33

The antimicrobial activity of supernatants from recombinant *P. pastoris* X-33, was purified using a previously described procedure (Jiménez et al., 2014). However, recombinant *P. pastoris* X-33 producers of bacteriocins were previously grown in BMMY buffered methanol

complex medium at 30°C during 0 to 96 h, to determine maximum antimicrobial activity. Finally, supernatants from 0.5-L cultures of the recombinant yeasts, grown in BMMY buffered methanol complex medium at 30°C were precipitated with ammonium sulfate, desalted by gel filtration (PD-10 columns), and subjected to cation exchange- (SP Sepharose Fast Flow), followed by hydrophobic interaction- (Octyl Sepharose CL-4B) and reverse phase-chromatography in a Fast Protein Liquid Chromatography system (RP-FPLC) (GE Healthcare, Barcelona, Spain) using the SOURCE<sup>TM</sup> 5RPC ST 4.6/150 column (GE, Healthcare). All chromatographic columns and supporting gels were from GE Healthcare. The antimicrobial activity of purified fractions was evaluated against *P. damnosus* CECT4797, by using the MPA.

### **VII.3.5 Cloning of the synthetic genes *entHF* and *entCRL35* in *P. pastoris* X-33, using the SUMOpro-3<sup>®</sup> gene fusion technology**

#### **VII.3.5.1 Construction of the pP- $\alpha$ SUMO3-EntHF and pP- $\alpha$ SUMO3-EntCRL35 expression vectors and transformation into *P. pastoris* X-33**

The *Pichia* hSUMO3 Expression System (SUMO-Pro-3<sup>®</sup> Gene Fusion Technology, LifeSensors Inc., Malvern, PA, USA), facilitates expression of a peptide or protein of interest as a fusion construct with hSUMO3 (human small ubiquitin-like modifier). The pP- $\alpha$ SUMO3 protein expression vector was used for cloning the synthetic genes encoding EntHF and EntCRL35. In order to generate the pP- $\alpha$ SUMO3-EntHF and pP- $\alpha$ SUMO3-EntCRL35 derivatives with a 6-His tag added to the N-terminus of hSUMO3, the pP- $\alpha$ SUMO3 vector was digested with *BsmBI* leaving two unique overhangs, ACCT at the 5'-end and CTAG at the 3'-end. The synthetic genes *entHF* and *entCRL35* were PCR amplified using primers HFSUMO-F/HFSUMO-R and CRL35SUMO-R and digested with *BsaI*, that produced an overhang complementary to ACCT and with *XbaI*, that produced an overhang complementary to CTAG. The digested vector and fragments were ligated, and further transformed into *E. coli* JM109 competent cells. The recombinant plasmids were identified by colony PCR using priming sites present in the vector (PAOX1SUMO-F/TAOX1SUMO-R) and DNA sequencing of the inserts. Primers and inserts used for these constructions, are listed in Table 3. The pP- $\alpha$ SUMO3-EntHF and pP- $\alpha$ SUMO3-EntCRL35 vectors were linearized with *SacI* and transformed into competent *P. pastoris* X-33. Positive transformants were selected on YPD (1% yeast extract, 2% peptone and 2% dextrose) agar supplemented with zeocin (100 and 1,000  $\mu$ g/mL) and sorbitol (1 M). PCR and DNA sequencing of inserts showed that hSUMO3-EntHF and hSUMO3-EntCRL35 were successfully integrated into the *P. pastoris* genome. The *P. pastoris* X-33 (pP- $\alpha$ SUMO3) negative control, selected with the vector without insert was also included in the study.

**Table 3. Primers and PCR products used in this study**

Primer, PCR product or bacteriocin	Nucleotide sequence (5'-3') or description	Amplifications
<b>Primers</b>		
JPKE-F	GAGGTACCGAATTCTCGAGAAAAGAAC	R-EntA, IT1-EntA-EntA, IT3-EntA-EntA, IT1-EntA-EntHF, IT3-EntA-EntHF, IT1-EntA-EntCRL35, IT3-EntA-EntCRL35
EAS-R	ATCGTTGGCGGCCGCTTCGACCTTCCCTTAACACTTACCTGGGATAGC	R-EntA
S071-F	GTCCAGAGCTCGAATTCTCGAGAAAAG	R-EntHF, R-EntCRL35, R-EntA::EntHF, R-EntCRL35
SARP-R	GCGGCCGCAACTTATGGTACCT	R-EntHF, R-EntCRL35
AHF-R	ATCGTTGGCGGCCGCTTCGACCTTCCCTTAACCCTTCCAA CCAG	R-EntA::EntHF, IT2-EntA-EntHF
HF-F	AAGTACTACGGTAACGGTGTTTCC	IT2-EntA-EntHF, IT2-EntA-EntCRL35
ACRL-R	ATCGTTGGCGGCCGCTTCGACCTTCCCTTAAGATTTCCAA CC	R-EntA::EntCRL35, IT2-EntA-EntCRL35, IT3-EntA-EntCRL35
AGGGHF-R	TACAGGAAACACCGTTACCGTAGTACTTACCACCACCACA CTTACCTGGGATAGC	IT1-EntA-EntHF, IT1-EntA-EntCRL35
ENTA-R	CGTAGTACTTACCGGAGTGAGTAGTACCACCACCACACTT ACCTGGGATAGCAC	IT1-EntA-EntA
ENTAGGG-R	ATCGTTGGCGGCCGCTTCGACCTTCCCTTAACACTTACCT GGGATAGCAC	IT2-EntA-EntA, IT3-EntA-EntA
ENTA-F	ACTACTCACTCCGGTAAGTACTACG	IT2-EntA-EntA
ENTP-F	CAAGGCCACGTGTCTTGCTC	R-EntP, R-EntP::EntHF, R-EntP::EntCRL35
PHFCRL-R	CCATGAGGCCAGTCTTGCTG	R-EntP, R-EntP::EntHF, R-EntP::EntCRL35
ALFA-F	TACTATTGCCAGCATTGCTGC	pPICZ $\alpha$ amplification fragment including the cloned synthetic gene

3AOX1-R	GCAAATGGCATTCTGACATCC	pPICZ $\alpha$ A amplification including the cloned synthetic gene
HFSUMO-F	CAGAATTGGTCTCCAGGTAAGTACTACGGTAACGGT	R-SUMO-EntHF, R-SUMO-EntCRL35
HFSUMO-R	TGGATCGTCTAGATCAACCCTTCCAACCAGCCTTA	R-SUMO-EntHF
PAOX1SUMO-F	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	pP- $\alpha$ hSUMO3 amplification including the cloned synthetic gene and SUMO region
TAOX1SUMO-R	GGATGTCAGAATGCCATTGC	pP- $\alpha$ hSUMO3 amplification including the cloned synthetic gene and SUMO region
CRL35SUMO-R	TGGATCGTCTAGATCAAGATTTC AACCAGCAGCA	R-SUMO-EntCRL35

### PCR products

R-EntA	196-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to the mature synthetic <i>entA</i> gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage and TAAGGG as stop codon
R-EntP	234-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to the mature synthetic <i>entP</i> gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage and TAAGGG as stop codon
R-EntHF	185-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to the mature synthetic <i>entHF</i> gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage and TAA as stop codon
R-EntCRL35	185-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to the mature synthetic <i>l1077</i> gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage and TAA as stop codon
R-EntA:: <i>EntHF</i>	202-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to the mature synthetic <i>enta::<i>entHF</i></i> gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage and TAAGGG as stop codon

R-EntA::EntCRL35	202-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to the mature synthetic <i>entA::entCRL35</i> gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage and TAAGGG as stop codon
R-EntP::EntHF	228-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to the mature synthetic <i>entP::entHF</i> gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage and TAAGGG as stop codon
R-EntP::EntCRL35	228-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to the mature synthetic <i>entP::entCRL35</i> gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage and TAAGGG as stop codon
IT1-EntA-EntA	202-bp intermediate <i>XhoI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to the mature synthetic <i>entA</i> gene, the linker GGG and the beginning of the next <i>entA</i> gene of the construction
IT2-EntA-EntA	171-bp intermediate <i>NotI</i> fragment containing the second <i>entA</i> gene
IT3-EntA-EntA	340-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the full <i>entA-entA</i> gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage and TAAGGG as stop codon
IT1-EntA-EntHF	214-bp intermediate <i>XhoI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to the mature synthetic <i>entA</i> gene, the hinge GGG and the beginning of <i>entHF</i> gene
IT2-EntA-EntHF	159-bp intermediate <i>NotI</i> fragment containing the <i>entHF</i> gene
IT3-EntA-EntHF	325-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the full <i>entA-entHF</i> gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage and TAAGGG as stop



codon

IT1-EntA-EntCRL35	203-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to the mature synthetic <i>entA-entHF</i> gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage
IT2-EntA-EntCRL35	159-bp intermediate <i>NotI</i> fragment containing the <i>entCRL35</i> gene
IT3-EntA-EntCRL35	325-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the full <i>entA-entCRL35</i> gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage and TAAGGG as stop codon
R-SUMO-EntHF	149-bp <i>BsaI/XbaI</i> fragment containing the hSUMO3 fusion protein and EntHF
R-SUMO-EntCRL35	149-bp <i>BsaI/XbaI</i> fragment containing the hSUMO3 fusion protein and EntCRL35

---

### VII.3.5.2 Expression and purification of hSUMO3 fused to EntHF and EntCRL35

Supernatants from *P. pastoris* X-33hSUMO3-EntHF and *P. pastoris* X-33hSUMO3-EntCRL35, were evaluated for expression of hSUMO3-EntHF and hSUMO3-EntCRL35 by immuno dot-blot. Briefly, 15 mL aliquots from early stationary phase of 0.5 L cultures of the recombinant yeasts, grown in BMMY buffered methanol complex medium at 30°C were taken at different times (0 to 96h) and centrifuged (8,000 rpm, 5 min).

For analysis of supernatants by immuno dot-blot, polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) were pre-wetted for 15 sec in 100 % methanol for membrane activation and then, soaked in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 for 2 min. Then, 1-2 µL supernatant samples were spotted in membranes within a pre-marked grid. The membranes were then left to dry to fix the proteins to grid at room temperature (RT) for 30 min. After reactivation with methanol and equilibration with PBS, non-specific sites were blocked with 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS, pH 7.4 for either 1 h at 37°C or 4°C overnight, with agitation. The blocking solution was discarded and membranes were washed three times with PBS, 0.05% Tween 20 (PBS-T). Membranes were then incubated for 2 h at 37°C, with agitation with the primary antibody (anti-hSUMO3 antibody, dilution 1:5,000 PBS, 0.05% Tween 20, 1% BSA) (LifeSensors, Inc.) followed by three-times washing with PBS-T. Incubation with the secondary antibody was performed using donkey anti-chicken IgY antibody, HRP-conjugate (Thermo Scientific Pierce Antibodies, Rockford, IL, USA) (dilution 1:7,500) for 2 h at 37°C, with agitation. The membranes were washed with PBS-T and incubated in Clarity Western ECL substrate chemiluminescent detection reagent (Bio-Rad) for 5 min at RT prior to image acquisition. The chemiluminescent blots were imaged with the ChemiDoc XRS system (Bio-Rad).

The affinity 6-His tag into the N-terminus of hSUMO3-EntHF and hSUMO3-EntCRL35, permitted purification of the fusion proteins by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) using HisPur<sup>TM</sup> Ni-NTA Spin columns (Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Briefly, supernatants from 72 h of 0.5 L cultures of *P. pastoris* X-33-hSUMO3-EntHF and *P. pastoris* X-33-hSUMO3-EntCRL35 were freeze-dried, resuspended in equilibration buffer with 10 mM imidazole and mixed with 3 mL resin Ni-NTA for 30 min at RT. After being spun down, the resin was washed twice with two-resin volumes of 25 mM imidazole buffer and centrifuged at 700 x g for 2 min. The His-tagged proteins were eluted in three consecutive steps of centrifugation (700 x g for 2 min) with one-resin volume of imidazole buffer (250 mM) each time. The amount of protein in samples was determined with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Rockland, DE, USA), and the fraction with the highest concentration was selected for further analysis. The imidazole in samples was removed by diafiltration using Amicon Ultra-4 centrifugal filter devices (Millipore, Billerica, MA, USA). To cleave the hSUMO3 fusion tag, SUMO protease 2 (LifeSensors, Inc.) was added at 1 unit per 100 µg of substrate and incubated at 30°C during 3 h in PBS, pH 7.5, 2 mM dithiothreitol. The protein digest was loaded onto the Ni-NTA resin to remove hSUMO3 and SUMO protease 2, both with the with 6 × His tag, and possibly undigested fusion proteins. The flow-through fractions were analysed by immuno dot-blot.

The antimicrobial activity of the fractions was determined against *P. damnosus* CECT4797, by using the MPA.

#### **VII.3.5.6 Mass spectrometry (MS) and multiple reaction monitoring (MRM) analysis of the purified peptide fractions from supernatants of recombinant *P. pastoris* X-33**

Purified fractions from supernatants of *P. pastoris* X-33 producers of native, hybrid and bacteriocin-derived chimeras and from hSUMO3-derived fusion peptides, were subjected to matrix-assisted laser desorption–ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) at the Unidad de Proteómica, Universidad Complutense de Madrid (Madrid, Spain). Briefly, 1 µL sample was spotted onto a MALDI target plate and allowed to air-dry at room temperature. Then, 0.4 µL of a 3 mg/mL of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany) in 50% acetonitrile were added to the dried peptide, digest spots and allowed again to air-dry at room temperature. MALDI-TOF MS analyses were performed in a 4800 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA), operated in 1 KV reflector mode. All mass spectra were calibrated externally using a standard peptide mixture (AB Sciex, Foster City, CA, USA).

Multiple Reaction Monitoring (MRM) analysis was performed to determine the presence of bacteriocins in the purified fractions. First, purified fractions were dried and resuspended in 20 µL of 25 mM ammonium bicarbonate. All samples were reduced by adding 10 mM DTT for 45 min at 57°C and alkylated with 55 mM iodoacetamide during 30 min in the dark. Then, digestion was performed by adding sequencing grade trypsin (Roche, Basel, Switzerland) 1:40 (w/w) overnight at 37°C. Subsequently, the peptides were cleaned up with Millipore® Ziptips C18 (Millipore). Peptides were eluted with 80% acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and finally, peptides were dried in Speed-vac and resuspended in 0.1% formic acid. The samples were stored at -20 °C before nano Liquid Chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis. MRM-MS analysis was applied to samples to detect only the proteins of interest in this study, at the Unidad de Proteómica, Universidad Complutense de Madrid (Madrid, Spain). Skyline (64-bit) version 1.6 was used to build and optimize the MRM methods for identification of peptides (MacLean et al., 2010). Fasta-formatted sequences of 2 proteins were used for *in silico* tryptic digestion, restricting the prediction of peptides to those from 6 to 27 amino acids in length and assuming as maximum 1 missed cleavage for trypsin. Skyline was used to predict and optimize collision energies for each peptide. The resultant methods were exported to Analyst 1.6 (AB Sciex), mass spectrometer acquisition software. Additional MRM analysis were developed on peptides for poor peak intensity, low quality peak resolution, or inability to identify three transition ions in peptides. The final MRM methods included the monitoring of at least three transitions per peptide with a 20 ms dwell time.

All analyses were performed on a LC-MS/MS system consisting of a Eksigent Nanoflow LC system coupled to a hybrid triple quadrupole/ion trap mass spectrometer 5500 QTRAP® (AB Sciex) operated in MRM and equipped with a nano electrospray interface operated in the

positive ion mode MRM-ESI-LC/MS/MS (QTRAP). Five  $\mu\text{L}$  of the digested sample was directly loaded onto an Eksigent trap column (NanoLC Trap Set ChromXP C18-3 $\mu\text{m}$ , 120 Å, 350  $\mu\text{m}$  x 0.5 mm) at 3  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Following 5 min of loading, the peptides were separated onto an Eksigent 75  $\mu\text{m}$  x 15 cm ChromXP nano LC column at 300 nL/min. The gradient used was 3-35% solvent B in 90 min. Solvent A was 99.9% water with 0.1% formic acid and solvent B was 99.9% acetonitrile with 0.1% formic acid. The 5500 QTRAP was operated in MRM mode. The MRM transition intensities were used to trigger dependent enhanced product ion (EPI) scans. This data-dependent method is referred to as targeted MRM-IDA or MIDAS (Multiple Reaction-Monitoring Information-Dependent Acquisition). This MIDAS workflow can develop MRM-MS methods in one step, so the MS/MS obtained from the targeted detection can be submitted to a database search to confirm that the detected peptide is the peptide of interest. The data acquired in the 5500 QTRAP were analyzed in Skyline software where they were manually inspected to confirm the peptides and transitions that provided accurate detection of peptides/proteins. The MS/MS data were analyzed using Protein Pilot 4.5 software (AB Sciex) or MASCOT 2.3 (MatrixScience, London, UK) to identify the peptides against in house DataBase with the fasta sequences of targeted proteins. The searches were performed assuming digestion with trypsin with a maximum of 1 missed cleavage; a fragment ion mass tolerance of 0.6 Da and a parent ion tolerance of 0.15 Da. Carbamidomethylcysteine was specified as fixed modification and oxidation of methionine as variable modifications. Peptide identifications based on MS/MS data were accepted if they could be established at greater than 95% CI ( $p < 0.05$ ) and then they used by Skyline to generate a spectral library. Data were then processed against the MRM-library on Skyline to ensure consistency between the transitions detected and the sequences of peptide searched (dotp).

#### VII.3.5.7 Antimicrobial activity of the chemically synthesized EntP::EntHF

The antimicrobial activity of the biologically produced EntHF::EntCRL35 chimera and the chemically synthesized EntP::EntHF<sub>synth</sub> peptide was tested against *Listeria spp.*, by the MPA. The synthetic peptide was obtained from GenScript Inc., Piscataway, NJ, (USA). A concentration of 0.1 mg/mL of the synthetic peptide in distilled water (mQH<sub>2</sub>O) with 0.1% TFA, was used in the assay.

#### VII.3.5.8 Three-dimensional (3D) homology modeling

Three-dimensional (3D) structure homology models for native EntA, EntP and EntCRL35, for hybrid EntA::L::EntA, EntA::L::EntHF and EntA::L::EntCRL35, and for the bacteriocin-derived chimeras EntA::EntHF, EntA::EntCRL35, EntP::EntHF and EntP::EntCRL35, were determined using the template-based I-TASSER server (Zhang, 2008; Roy et al., 2010; Yang et al., 2015). The images were rendered using PyMOL (DeLano, 2002).

## VII.4. RESULTS

### VII.4.1 Cloning of synthetic genes encoding native, hybrid and bacteriocin-derived chimeras and their expression

The cloning of synthetic genes, designed from the amino acid sequence of native (EntHF and EntCRL35) bacteriocins, from hybrid bacteriocins (EntA::L::EntA, EntA::L::EntHF and EntA::L::EntCRL35) and from the bacteriocin-derived (EntA::EntHF, EntA::EntCRL35, EntP::EntHF and EntP::EntCRL35) chimeras into the expression vector pPICZ $\alpha$ A, generated the recombinant plasmids pEntHF, pEntCRL35, pEntA::L::EntA, pEntA::L::pEntHF, pEntA::L::EntCRL35, pEntA::EntHF, pEntA::EntCRL35, pEntP::EntHF and pEntP::EntCRL35 (Table 2). Similarly, cloning of the *entHF* and *entCRL35* synthetic genes into the expression vector pP- $\alpha$ hSUMO3, generated the recombinant plasmids pP- $\alpha$ hSUMO3-EntHF and pP-h $\alpha$ SUMO3-EntCRL35. Transformation of linearized plasmids and plasmid controls into competent *P. pastoris* X-33, permitted the isolation of the corresponding zeocin-resistant *P. pastoris* X-33 recombinants.

However, none of the *P. pastoris* X33 recombinants encoding the native and hybrid bacteriocins, showed a direct antimicrobial activity against *P. damnosus* CECT4797 by the SOAT. Only *P. pastoris* X-33EntA::EntHF (2.2%, 2 out of 90 colonies), *P. pastoris* X-33EntP::EntHF (32.5%, 39 out of 120 colonies) and *P. pastoris* X-33EntP::EntCRL35 (18.3%, 22 out of 120 colonies) showed direct antimicrobial activity against *P. damnosus* CECT4797 by the SOAT (results not shown). Recombinant yeasts with direct antimicrobial activity showed larger halos of inhibition when selected with 1,000  $\mu$ g/mL than with 100  $\mu$ g/mL of zeocin. None of the recombinant *P. pastoris* X33, encoding the hSUMO3-EntHF and hSUMO3-EntCRL35 fusion proteins, showed direct antimicrobial activity by the SOAT.

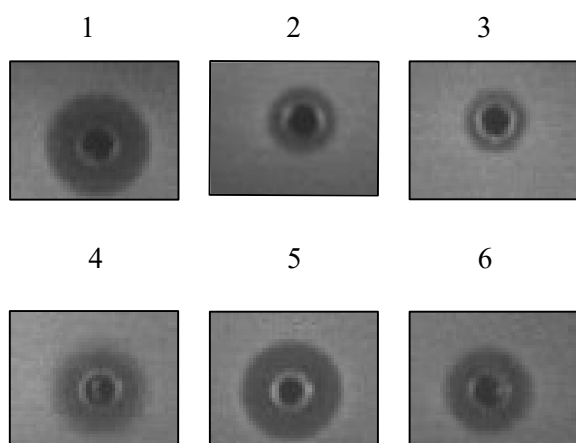
### VII.4.2. Production and purification of bacteriocins from supernatants of recombinant *P. pastoris* X-33

All recombinant *P. pastoris* X-33, encoding native and hybrid bacteriocins were grown on BMMY buffered methanol complex medium for production of the encoded bacteriocins. However, no antimicrobial activity was detected in their supernatants when assayed by an agar diffusion assay (ADT) and a microtiter plate assay (MPA). However, the antimicrobial activity of cell free supernatants from recombinant *P. pastoris* X-33, producers of bacteriocin-derived chimeras, was visualized by ADT (Figure 1). Furthermore, all recombinant *P. pastoris* X-33 encoding bacteriocin-derived chimeras were grown in BMMY buffered with methanol, to determine production and antimicrobial activity of the bacteriocin-derived chimeras (Table 4).

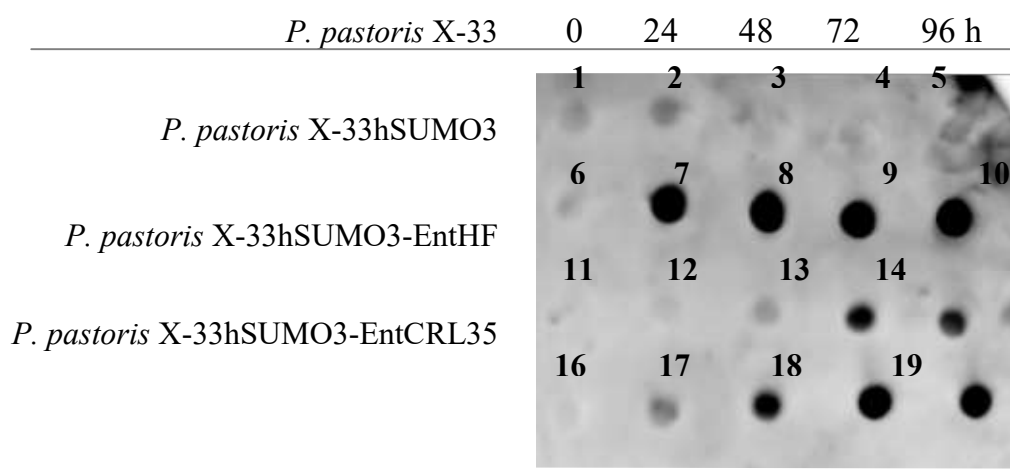
Furthermore, although recombinant *P. pastoris* encoding native and hybrid bacteriocins were not able to show antimicrobial activity, the supernatants from all recombinant yeasts were subjected to a multichromatographic purification procedure. The supernatants from recombinant *P. pastoris* X-33, encoding EntHF or EntCRL35, did not show antimicrobial activity in their purified fractions. However, recombinant yeasts producers of hybrid

bacteriocins showed antimicrobial activity in some of the purified fractions from their supernatants and, mostly, in the reversed-phase eluate (Table 5). Importantly, all purified fractions from recombinant *P. pastoris* X-33 encoding bacteriocin-derived chimeras, showed antimicrobial activity as the fractions were increasingly purified (Table 5).

The production and purification of EntHF and EntCRL35 by the *Pichia* hSUMO3 expression system, was evaluated by immuno dot-blot. The results obtained from concentrated supernatants of recombinant yeasts encoding hSUMO3-EntHF and hSUMO3-EntCRL35, showed production of both fusion proteins at 48 to 72 h of growth of the producer strains, and possibly a larger production of the fusion proteins by the former as compared to the latter producer (Figure 2). However, cleavage of the hSUMO3 fusion tag with the SUMO protease 2 and removal of the fusion tag by IMAC, did not show antimicrobial activity of the flow-through fractions against *P. damnosus* CECT4797 as the indicator organism, and MPA.



**Figure 1.** Antimicrobial activity of cell free supernatants of *P. pastoris* X-33EntA (1), *P. pastoris* X-33EntA::EntHF (2), *P. pastoris* X-33EntA::CRL35 (3), *P. pastoris* X-33EntP (4), *P. pastoris* X-33EntP::EntHF (5), and *P. pastoris* X-33EntP::CRL35 (6) against *P. damnosus* CECT4797 as the indicator microorganism, by using an agar diffusion test (ADT).



**Figure 2.** Immuno dot-blot of concentrated supernatants from *P. pastoris* X-33, *P. pastoris* X-33hSUMO3, *P. pastoris* X-33hSUMO3-EntHF and *P. pastoris* X33hSUMO3-EntCRL35, grown in BMMY buffered methanol medium for 0, 24, 48, 72 and 96 h. Numbers (1 to 20) indicate where samples were spotted.

**Table 4. Growth<sup>a</sup> and antimicrobial activity<sup>b</sup> of supernatants from recombinant *P. pastoris* X-33 derivatives, encoding bacteriocin-derived chimeras**

Time (hours)	<i>P. pastoris</i> X-33											
	Wild type		pPICZ $\alpha$ A		Encoding EntA::EntHF		Encoding EntA::EntCRL3		Encoding EntP::EntHF		Encoding EntP::EntCRL35	
	OD <sub>600</sub>	BU/mL	OD <sub>600</sub>	BU/mL	OD <sub>600</sub>	BU/mL	OD <sub>600</sub>	BU/mL	OD <sub>600</sub>	BU/mL	OD <sub>600</sub>	BU/mL
0	1.0	----	1.0	----	1.0	----	1.0	----	1.0	----	1.0	----
8	4.0	----	3.4	----	3.9	26	4.2	----	3.9	----	3.8	----
12	5.8	----	5.0	----	5.8	29	5.2	25	5.5	103	4.9	2,720
15	6.5	----	6.0	----	6.4	44	6.3	32	6.4	1,973	5.8	2,161
24	7.6	----	6.4	----	8.7	73	7.7	54	7.9	3,779	7.4	34
36	9.3	----	7.6	----	8.9	351	7.5	----	8.0	2,060	7.8	139
48	9.7	----	9.0	----	8.7	719	10.9	----	8.2	5,190	10.7	396
72	12.8	----	12.8	----	12.9	----	13.6	----	10.5	11,129	12.4	----
96	17.1	----	15.2	----	13.1	----	15.1	----	10.9	9,224	11.5	----

<sup>a</sup>OD<sub>600</sub>, optical density of cultures at 600 nm. <sup>b</sup>Antimicrobial activity against *P. damnosus* CECT4797 by using a microtiter plate assay (MPA), in bacteriocin units per milliliter (BU/mL). ----, No antimicrobial activity.

**Table 5. Antimicrobial activity<sup>a</sup> of eluted fractions from purified supernatants of recombinant *P. pastoris* X-33 derived strains**

Strain	Antimicrobial activity (BU/mL) <sup>a</sup>					
	SN	AS	GF	SE	OE	RP-FPLC
<i>P. pastoris</i> X-33						
EntHF	----	----	----	----	----	----
EntCRL35	----	----	----	----	----	----
EntA::L::EntA	----	----	156	1,740	280,549	87,860
EntA::L::EntHF	----	----	----	----	329	4,171
EntA::L::EntCRL35	----	----	----	28	221	936
EntA::EntHF	215	2,348	305	594	4,064	23,073
EntA::EntCRL35	74	42,669	3,821	9,438	22,314	24,772
EntP::EntHF	3,280	1,170	960	5,210	47,605	268,972
EntP::EntCRL35	1,610	811	31,761	3,512	9,600	31,831
pPICZ $\alpha$ A	----	----	----	----	----	----
Wild Type	----	----	----	----	----	----

<sup>a</sup> Antimicrobial activity against *P. damnosus* CECT4797 by using a microtiter plate assay (MPA), in bacteriocin units per milliliter (BU/mL). ---: No antimicrobial activity. Eluted fractions: SN: supernatant; AS: ammonium sulfate precipitation; GF: gel filtration; SE: Sepharose fast flow eluate; OE: Octyl Sepharose eluate; RP- FPLC: reversed-phase eluate.

#### VII.4.3 Mass spectrometry (MS) analysis and multiple reaction monitoring (MRM) analysis of the purified bacteriocin fractions

MALDI-TOF MS analysis of eluted fractions from the last RP-FPLC step from purification of native, hybrid and bacteriocin-derived chimeras as well as from the flow through eluates derived from digestion of the hSUMO3 fusion peptides, did not reveal the presence of peptides with the expected molecular mass of the bacteriocin being produced (results not shown). Since this was a totally unexpected result, mostly from those purified fractions with larger antimicrobial activity, the fractions from the last RP-FPLC step were submitted to MRM analysis to determine the presence of bacteriocins in the purified fractions. Knowing the mass and structure of the analyte molecule, it is possible to predict the precursor  $m/z$  and fragments  $m/z$  (MRM transition). Each targetted peptide has a set of accompanying transitions that are then selectively detected in the second stage of the mass spectrometer. A summary of the results obtained is shown in Table 6. MRM transitions were established and validated by tandem mass spectrometry (MS/MS). For each hybrid and bacteriocin-derived chimera, at least one unique encrypted peptide was confidently detected in duplicate runs.



For the hybrid EntA::L::EntA bacteriocin, 6 peptides were confirmed by MS/MS (dotp 0.9), with at least 5 transitions, 3 of them consecutive, covering 68% of the complete EntA sequence. This coverage could be extended up to a 100% considering repetitive sequences in the hybrid bacteriocin. Similarly, two peptides were detected on the EntA::L::EntHF MRM designed method, covering 39% of the sequence of the hybrid EntA::L::EntHF bacteriocin. The peptide ATTCIAGMSIGGFLGGAIPGK was verified by MS/MS (dotp 0.79), while the other one, CGGGKYYGNGVSCNK, with larger number of transitions, could not be confirmed by MS/MS. By using this analysis, 82% of the peptide sequence was detected for the hybrid EntA::L::EntCRL35 bacteriocin; 3 peptides were detected by MRM, 2 of them were confirmed by MS/MS in the sample (ATTCIAGMSIGGFLGGAIPGK; YYGNGVSCNK) and, the other one, confirmed by MS/MS in the constructed library (YYGNGVYCTK; CTVDWAK; ATTCIAGMSIGGFLGGAIPGK) (dotp > 0.8) (Table 6).

The MRM method designed to detect the bacteriocin-derived EntA::EntHF chimera in the purified fractions, was able to confirm the presence of 4 encrypted peptides of this bacteriocin by MS/MS (dotp > 0.9), with at least 5 transitions, 3 of them consecutive, covering 89.6% of the sequence of the EntA::EntHF chimera. Furthermore, a coverage of 100% of the sequence may be assumed if we consider the AIGIIGNNAAANLTTGGKAGWKG peptide, which was detected by MRM but could not be confirmed by MIDAS workflow, very likely because of the low quality spectra. For the EntA::EntCRL35 chimera, the designed MRM method detected 2 peptides confirmed by tandem MS/MS (dotp of 0.9) with at least 5 transitions, 3 of them consecutive and covering the 33% of the target sequence (Table 6). The SYGNGVYCNSK encrypted peptide present in both, the EntP::EntHF and EntP::EntPCRL35 chimeras, was only MRM identified and verified by MS/MS in the EntP::EntHF chimera and in which 4 transitions were detected, at least 3 of them consecutive (dotp 0.95). However, this peptide was not detected in the purified fraction containing the EntP::EntCRL35 chimera. None of the other encrypted peptides included in the designed MRM method for these chimeras was confirmed by MS/MS, but the CWFNVWGK peptide fragment, common in both bacteriocins and the AIGIIGNNAAANLTTGGK peptide fragment, present only in the EntP::EntHF chimera, were detected with at least 3 consecutive transitions. The peptide AIGIIGNNSAANLATGGAAGWK encrypted into the EntP::EntCRL35 chimera, was not detected in the purified fractions containing this bacteriocin (Table 5).

When the hSUMO3, hSUMO3-EntHF and hSUMO-EntCRL35 proteins, produced by recombinant *P. pastoris* X-33, were proteolytically digested and purified by IMAC, MRM methods were designed to detect the cloned bacteriocins in the purified flow through fractions (Table 5). By using this proteomic analysis, 2 hSUMO3 encrypted peptides were detected, but only one confirmed by MS/MS (dotp 0.95). Peptide fragments corresponding to the native bacteriocins EntHF and EntCRL35, with at least 3 consecutive transitions, were detected for both bacteriocins, but could not be verified by MS/MS possibly due to low quality of the purified fraction (Table 5).

**Table 6. Peptide fragments identified by MRM-ESI-LC-MS/MS (QTRAP), in purified supernatants from recombinant *P. pastoris* X-33**

Peptide sequence	Precursor MW (z)	Detected m/z	Detected transitions	MS/MS confirmation
<b>EntA::L::EntA</b>				
YYGNGVYCTK	1223.53	612.77	6	YES
TTHSGKYYGNGVYCTK	1834.9	612.62	6	YES
CGGGTTTHSGK	861.4	481.21	8	NO
CTVDWAK	879.4	440.20	5	YES
ATTCIAGMSIGGFLGGAIPGK	1978.99	990.00	8	YES
ATTCIAGMSIGGFLGGAIPGK	1978.99	660.34	7	YES
ATTCIAGMSIGGFLGGAIPGK	1993.99	998.00	10	YES
ATTCIAGMSIGGFLGGAIPGK	1993.99	665.67	8	YES
<b>EntA::L::EntHF</b>				
ATTCIAGMSIGGFLGGAIPGK	1993.9	665.67 (+3)	3	YES
CGGGKYYGNGVSCNK	1611.8	540.9(+3)	5	NO
<b>EntA::L::EntCRL35</b>				
YYGNGVYCTK	1223.53	612.77(+2)	6	YES
CTVDWAK	879.4	440.20(+2)	4	YES
ATTCIAGMSIGGFLGGAIPGK	1978.99	990.00(+2)	9	YES
ATTCIAGMSIGGFLGGAIPGK	1978.99	660.34(+3)	8	YES
<b>EntA::EntHF</b>				
TTHSGKYYGNGVYCTK	1834.9 (+3)	612.62	9	YES
YYGNGVYCTK	1223.53 (+2)	612.77	5	YES
NKCTVDWGK	1106.52 (+2)	554.27	5	YES
AIGHIGNNAAANLTTGGK	1654.90 (+2)	828.46	6	YES
AIGHIGNNAAANLTTGGKAGWK	2097.13 (+3)	719.05	6	NO
<b>EntA::EntCRL35</b>				
	1305.3	681.79 (+2)	4	YES
TTHSGKYYGNGVYCTK	1834.9	612.62	5	YES
YYGNGVYCTK	1223.53	612.77	5	YES
<b>EntP::EntHF</b>				
SYGNGVYCNSK	1305.3	681.79 (+2)	4	YES
CWVNWGK	892	475.22 (+2)	3	NO
AIGHIGNNAAANLTTGGK	1541.7	771.43 (+2)	3	NO
<b>EntP::EntCRL35</b>				
SYGNGVYCNSK	1305.3	681.79 (+2)	Not detected	Not detected

CWVNWGK	892	475.22 (+2)	3	NO
AIGIIGNNSAANLATGGAAGWK	2027.2	1014.03 (+2) 676.36 (+3)	Not detected	Not detected
<b>SUMO</b>				
VAGQDGSVVQFK	1234.64	617.82(+2)	6	NO
EGVKTENDHINTK	1484.73	742.87(+2)	5	YES
<b>SUMO-HF</b>				
AIGIIGNNAAANLTTGGKAGWKG	2155.16	719.05(+3)	7	NO
<b>SUMO-CRL35</b>				
AIGIIGNNSAANLATGGAAGWKS	2027.06	676.36 (+3)	5	NO

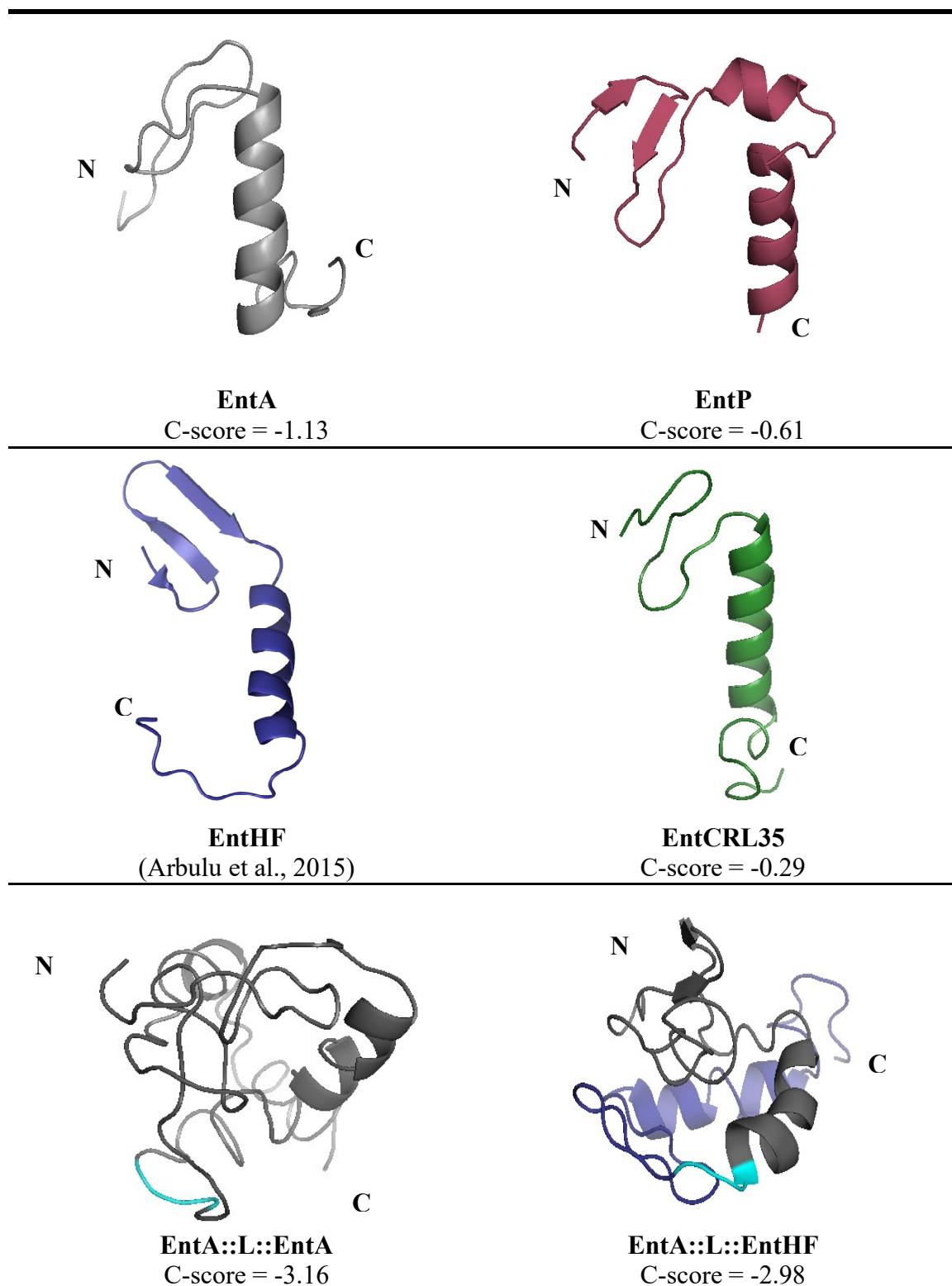
#### VII.4.4 Three-dimensional (3D) structures of bacteriocins predicted by homology modeling

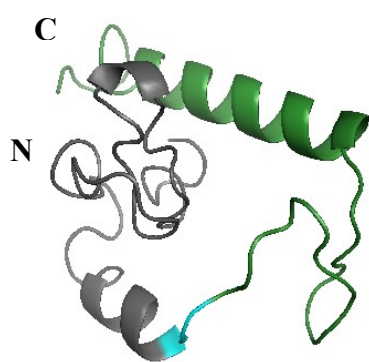
Good quality three-dimensional (3D) structures were predicted for the native bacteriocins EntHF and EntCRL35 and the bacteriocin-derived EntA::EntHF, EntA::EntCRL35, EntP::EntHF and EntP::EntCRL35 chimeras, with C-score values ranging from -1.13 to -0.29 (Figure 3). C-score values are based on the significance of threading template alignments and the convergence parameters on the structure assembly. C-score is typically in the range of -5 to 2, where a higher C-score suggest a model with a higher confidence. All these bacteriocins exhibited a  $\beta$ -sheet-like structure in their N-terminal end and a  $\alpha$ -helix with a random coil in their C-terminal region. However, I-Tasser predictions for the hybrid EntA::L::EntA, EntA::L::EntHF and EntA::L::EntCRL35 bacteriocins showed complex folding structures, where the two fused bacteriocins fold back into each other, creating steric impediments among the amino acids. For hybrid bacteriocins, the C-score values were low, -3.16 to -2.98 (Figure 3), which indicates low accuracy in their 3D structure prediction possibly because in these cases the query protein lacks a good template in peptide libraries.

#### VII.4.5 Antimicrobial activity of the synthetic EntP::EntHF<sub>synth</sub> peptide as compared to the EntP::EntHF chimera produced by *P. pastoris* X-33

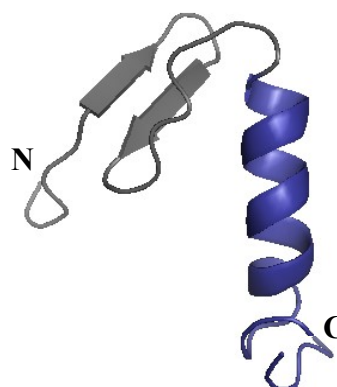
When the antimicrobial activity of the purified EntP::EntHF chimera, produced by *P. pastoris* X-33EntP::EntHF, was compared to that of the synthetic peptide EntP::EntHF<sub>synth</sub> both peptides showed a large antimicrobial activity against *Listeria* spp. Furthermore, whereas the synthetic peptide showed 1.1- to 11.3-times higher specific antimicrobial activity against 3 of the evaluated *Listeria* spp., the biologically produced EntP::EntHF chimera showed a 503- to  $1.0 \times 10^5$ -times higher specific antimicrobial activity against 3 out of the 6 *Listeria* spp. used as indicator strains (Table 7).

**Figure 3. Predicted three-dimensional (3D) structures of native, hybrid and bacteriocin-derived chimeras constructed in this study.** C-score for estimating the quality of predicted models. The solution structure of Ent HF was determined in a previous study (Arbulu et al., 2015). The N- and C-termini are indicated with N and C, respectively, and regions shaded in light blue indicates the position of the tri-Gly linker.

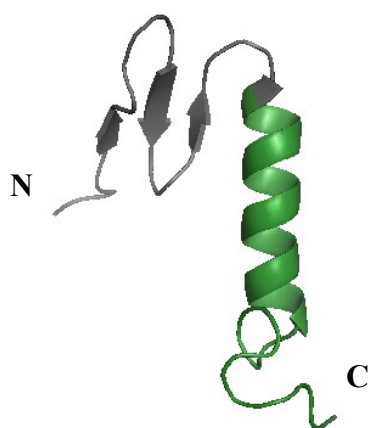




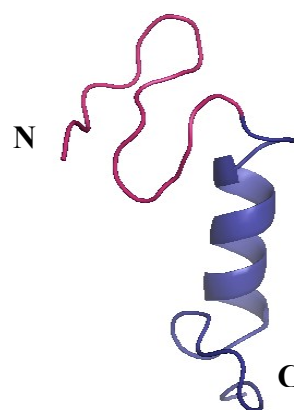
**EntA::L::EntCRL35**  
C-score = -3.03



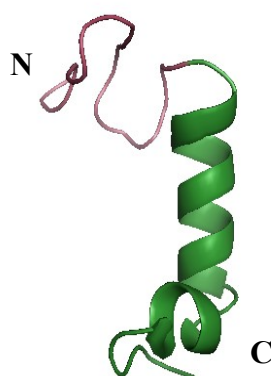
**EntA::EntHF**  
C-score = -0.60



**EntA::EntCRL35**  
C-score = -0.71



**EntP::EntHF**  
C-score = -0.69



**EntP::EntCRL35**  
C-score = -0.85

**Table 7. Antimicrobial activity<sup>a</sup> of purified EntP::EntHF chimera produced by recombinant *P. pastoris* X-33 and the chemically synthesized EntP::EntHF<sub>synth</sub> against *Listeria* spp.**

Bacteriocins	<i>L.</i> <i>ivanovii</i> CECT913	<i>L.</i> <i>seeligeri</i> CECT917	<i>L.</i> <i>welshimeri</i> CECT917	<i>L. monocytogenes</i>		
				CECT 911	CECT 939	CECT 4031
EntP::EntHF	30,055	101,695	11,085	9	4,701,244	52
EntP::EntHF <sub>synth</sub>	89,739	32	22	10	46	588

<sup>a</sup> Antimicrobial activity in bacteriocin units per nanogram (BU/ng) of purified bacteriocin.

<sup>b</sup> All *Listeria* spp. obtained from the CECT (Colección Española de Cultivos Tipo. Valencia, Spain).

Most of the data are means from two independent determinations in triplicate.

## VII.5 DISCUSSION

The overwhelming increase in antibiotic bacterial resistance is recognized as a global trend, that requires immediate attention (Cavera et al., 2015). To circumvent the proliferation of antibiotic-resistant and pathogenic emerging bacteria, bacteriocins produced by lactic acid bacteria (LAB) emerge as natural antimicrobial peptides with potential applications in food preservation, livestock protection and medical applications (Lohans and Vederas, 2012; Arbulu et al., 2015a). The production of bacteriocins by heterologous microbial hosts may provide an opportunity for their production in larger amounts and higher specific antimicrobial activity (Borrero et al., 2011a; Jiménez et al., 2013). Furthermore, the production of bacteriocins by yeasts may have some advantages over bacterial cells (Borrero et al., 2012; Jiménez et al., 2014; Arbulu et al., 2015b). Moreover, the use of synthetic genes matching the codon usage of the host microorganism can have a significant impact on gene expression levels and protein folding (Öberg et al., 2011; Jiménez et al., 2014).

Thus, of interest was to explore the potential of *P. pastoris* as producer of native, hybrid and bacteriocin-derived chimeras from class IIa bacteriocins with high antilisterial activity. Currently reclassified as *Komagataella pastoris*, *P. pastoris* has been developed as a host for large-scale protein expression (Cregg et al., 2000; Weinacker et al., 2014). Although class IIa bacteriocins share a high degree of similarity (40-60%), to date only a few class IIa bacteriocins including EntA, EntP and hiracin JM79 (HirJM79) have been successfully produced by a number of yeast platforms, including *P. pastoris* X-33 (Gutiérrez et al., 2005; Sánchez et al., 2008; Borrero et al., 2012; Jiménez et al., 2013; Jiménez et al., 2014). In this study, besides interest in production of the native bacteriocins EntHF and EntCRL35, the bacteriocin EntA was evaluated as a potential carrier peptide for production of hybrid bacteriocins fused by a tripeptide (tri-Gly) linker, whereas bacteriocin-derived chimeras were derived from fusion of the N-terminal region of EntA and EntP to the C-terminal end of EntHF and EntCR35 (Table 1).

Mature class IIa bacteriocins are mostly cationic and partly amphiphilic and/or hydrophobic peptides and they all share the conserved YGNG(V/L) motif (pediocin box) in their N-terminal region. Overall, all evaluated class IIa bacteriocins are unstructured in aqueous solutions but structured when exposed to membrane-mimicking solvents. Furthermore, it seems that class IIa bacteriocins contain two distinct domains separated by a flexible hinge. The first domain consists of a highly conserved, cationic N-terminal region as an S-shaped antiparallel  $\beta$ -sheet-like structure stabilized by a disulfide bridge whereas the second domain, which has less sequence conservation, contains a more hydrophobic and diverse helix-containing C-terminal half (Wang et al., 1999; Arbulu et al., 2015a). For class IIa bacteriocins it has been determined that their  $\beta$ -sheet-like N-terminal domain mediates initial binding to the target cell (Fimland et al., 2005; Nissen-Meyer et al., 2009) while the helix-containing C-terminal half penetrates into the hydrophobic core of target-cell membranes, docks to domains IIC and IID of the mannose phosphotransferase system (Man-PTS) and causes disruption of membrane integrity, leakage of solutes and eventually death of sensitive cells (Diep et al., 2007; Kjos et al., 2010). On the other hand, bioengineered bacteriocins have the potential to modify and expand the antimicrobial spectra of their parental peptides (Fimland et al., 1996; Johnsen et al., 2005; Acuña et al., 2012; Tiwari et al., 2015), and improve their stability against proteases (Papo et al., 2002). In this work, a Gly-Gly-Gly linker was inserted in the hybrid constructions EntA::L::EntA, EntA::L::EntHF and EntA::L::EntCRL35, to permit both bacteriocins to move freely against each other (Yuan et al., 2004; Field et al., 2008; Acuña et al., 2010; Acuña et al., 2012). Bacteriocin-derived chimeras were designed from fusion of the N-terminal region of bacteriocins EntA and EntP to the C-terminal end of EntHF or EntCRL35.

Synthetic genes for hybrid and bacteriocin-derived chimeras were cloned into pPICZ $\alpha$ A, whereas genes encoding native bacteriocins were cloned into the pPICZ $\alpha$ A and pP- $\alpha$ SUMO3 protein expression vectors. Competent *P. pastoris* X-33 transformed with the pPICZ $\alpha$ A- and pP- $\alpha$ SUMO3-derivatives, yielded zeocin-resistant recombinants encoding the target bacteriocins. However, unfortunately, recombinant yeasts encoding native and hybrid bacteriocins did not show antimicrobial activity when individual colonies were screened by a streak-on-agar test (SOAT) or when the antimicrobial activity was tested in their supernatants. Only the bacteriocin-derived chimeras showed direct antimicrobial activity (results not shown) and antimicrobial activity in their supernatants (Figure 1). Highly variable yields of secreted proteins have been achieved using the *P. pastoris* expression system and cases of low secretory yields or complete failure in protein production have also been reported (Love et al., 2012; Arbulu et al., 2015b). A number of factors may affect the production of foreign peptides by heterologous yeasts including copy number integration of the expression vectors in the yeast DNA, mRNA stability, errors in mRNA translation, uncoordinated rates of protein synthesis, folding and translocation, and undesired proteolysis of heterologous proteins by resident proteases or by proteases in the extracellular space being secreted, cell-wall associated or released into the culture medium as a result of cell disruption (Ni et al., 2008). The use of the *P. pastoris* expression system is known to be somewhat hampered by its unpredictable yields of production of heterologous proteins, which is now

believed to be caused in part by their varied efficiencies to traffic through the host secretion machinery (Love et al., 2012; Yang et al., 2013).

The pPICZαA protein expression vector, containing an strong and inducible promoter and the Kex2 signal cleavage site, has been used to drive the expression of synthetic genes encoding bacteriocins by *P. pastoris* X-33. Accordingly, the amino acid sequence following the Kex2 secretion signal may interfere with secretion of the fused peptides or proteins. Furthermore, the yields of recombinant proteins seem to be influenced by the Kex2 P1' site residue (Yang et al., 2013; Jiménez et al., 2013). In this study, the Kex2 P1' site residues for mature native EntHF and EntCRL35 were the amino acids Lys (K) and Lys (K), respectively, while the amino acids at the same Kex2 P1' site residues for the well expressed and biologically active bacteriocins EntA and EntP, produced by recombinant *P. pastoris*, were Thr (T) and Ala (A), respectively (Table 1). Thus, a much larger scientific effort would be devoted to characterize those N-terminal amino acids fused to the Kex2 signal cleavage and with major influence in protein production by recombinant *P. pastoris*. The design of hybrid bacteriocins derived from fusion of EntA to mature EntA, EntHF and EntCRL35 by means of a tri-Gly peptide, permitted the construction of hybrid proteins whose antimicrobial activity could not be detected in supernatants of the recombinant *P. pastoris*. However, design of the bacteriocin-derived quimeras EntA::EntHF, EntA::EntCRL35, EntP::EntHF and EntP::EntCRL35 permitted determination of their antimicrobial activity in supernatants of their recombinant *P. pastoris* producers (Table 4).

The use of a multi step chromatographic procedure for purification of the expected bacteriocins in supernatants of recombinant *P. pastoris* determined that, for hybrid but not native bacteriocins, eluted fractions from the last RP-FPLC step showed antimicrobial activity possibly due to removal of antimicrobial inhibitors, disaggregation of the bacteriocins or changes of conformation of the bacteriocins in the hydrophobic solvent (Table 5). While interesting, this was not an unexpected observation since purification of the circular bacteriocin garvicin ML, produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, showed a higher antibacterial activity and a broader antimicrobial spectrum as it was increasingly purified (Borrero et al., 2011b). The antimicrobial activity recovered from the supernatant of *P. pastoris* X-33, producer of the EntP::EntHF chimera, was much larger than that of the rest of the recombinant *P. pastoris*. Nevertheless, of interest is the significant decrease of antimicrobial activity after elution of supernatants from the different chromatographic columns and supporting gels (Table 5). Thus, a larger research work would be directed towards the design of novel and more effective chromatographic procedures for purification of novel bioengineered hybrid bacteriocins and bacteriocin-derived chimeras.

MALDI-TOF MS analysis of purified supernatants from all recombinant *P. pastoris*, mostly showed a large display of peptide fragments of different molecular mass than deduced from the calculated molecular mass of the cloned bacteriocins (Results not shown). The different molecular mass of the observed peptide fragments may suggest the existence of truncated bacteriocins, the interaction of bacteriocins with unknown biological compounds or the bacteriocins being subjected to post-translational modifications (PTM) such as



phosphorylation, acetylation, methylation, oxidation, formylation, disulfide bond formation and N-linked and O-linked glycosylation (Zhao and Jensen, 2009; Jiménez et al., 2013; Arbulu et al., 2015b). However, fortunately, the cloned bacteriocins were suitable for MRM evaluation and data analysis an emerging targeted proteomics workflow and highly selective and sensitive method detecting peptides in the low ng/mL to sub-ng/mL range concentrations (Malmström et al., 2007; Yocum and Chinayian, 2009). MRM transitions were established for at least one encrypted peptide within each native, hybrid or bacteriocin-derived chimera. Although not all of identified peptides could be validated by MS/MS, MRM proteomics proved the presence of the designed hybrid and bacteriocin-derived chimeras in purified fractions from the recombinant *P. pastoris* supernatants (Table 6).

Native EntHF and EntCRL35 were also cloned into *P. pastoris* X-33 using the SUMOpro-3<sup>®</sup> gene fusion technology. Immuno dot-blot experiments confirmed production of the hSUMO3, hSUMO3-EntHF and hSUMO-EntCRL35 fusion proteins in supernatants of the recombinant *P. pastoris* strains (Figure 2). Peptide fragments, corresponding to bacteriocins EntHF and EntCRL35 obtained after proteolysis of the fused proteins and IMAC purification, were also detected for both bacteriocins by MRM analysis (Table 6). However, the detected peptides could not be confirmed by MS/MS probably due to low concentration of the native bacteriocins or aberrant peptide folding. hSUMO3 fusion technology has been proposed for production of difficult to express proteins because enhances production yields, protein expression, solubility and folding, and facilitates protein purification (Butt et al., 2005). This technology is mostly used by expression of fused proteins by *E. coli* (Li et al., 2010; Zhang et al., 2014), although the NZ17074 antimicrobial peptide has been produced by *P. pastoris* using SUMO, as the fusion partner (Wang et al., 2014). Accordingly, further efforts should be taken to evaluate the behaviour of SUMO-mediated fusion tags for production and functional expression of bacteriocins by *P. pastoris*.

From the results obtained it may be suggested that very low yields of secreted and/or purified bacteriocins are obtained after cloning of synthetic genes encoding native, hybrid and bacteriocin-derived chimeras, in *P. pastoris*. This confirms previous observations in which bacteriocins, cloned in different yeast platforms, have been produced with variable success regarding their production, secretion and functional expression (Borrero et al., 2012; Jiménez et al., 2013; Arbulu et al., 2015b). Furthermore, since one of the main bottlenecks in recombinant protein production is the inability of foreign peptides to reach their native conformation in yeast hosts, it could happen that incorrectly folded native, hybrid and bacteriocin-derived chimeras are accumulated in the endoplasmic reticulum (ER) of recombinant *P. pastoris*, activating the unfolded protein response (UPR) and the ER-associated degradation (ERDA) of the misfolded bacteriocins, leading to persistent ER stress conditions causing much lower efficiencies to traffic through the host secretion machinery, apoptosis and cell death (Gasser et al., 2008; Stolz and Wolf, 2010; Love et al., 2012; Jiménez et al., 2013). The inconsistent secretory productivity of recombinant proteins has always been a major obstacle for routine utilization of *P. pastoris* as an eukaryotic protein expression system, in both research and industry (Yang et al., 2013).

Knowledge on the three-dimensional (3D) structure of class IIa bacteriocins is important to understand their antimicrobial activity, mode of action and rational bioengineering. In this study, homology modelling of native and bacteriocin-derived chimeras, performed by using the I-Tasser server, revealed good quality predictions with the evaluated bacteriocins exhibiting similar structures to class IIa bacteriocins whose 3D structures had been solved, including EntHF (Arbulu et al., 2015a) (Figure 3). This was expected, since the constructed peptides share a high degree of sequence similarity to other class IIa bacteriocins and I-Tasser is a template-based method for prediction of protein structure. However, the predicted 3D structures for the hybrid bacteriocins were not that accurate, with low C-score values and unordered and intricate structures. Apparently, the tri-Gly linker may not permit free movement of the two mature bacteriocins and they seem to collapse, probably yielding less functional structures as their low of antimicrobial activity suggest (Figure 3).

Comparison of the antimicrobial activity of the most active EntP::EntHF chimera produced by recombinant *P. pastoris* respect to the chemically synthesized EntP::EntHF<sub>synth</sub> peptide, showed that the biologically-produced bacteriocin chimera showed a higher specific antimicrobial activity than its synthetic counterpart against several *Listeria* spp., including *L. monocytogenes* (Table 7). Thus, it seems that not only the primary amino acid sequence but also the 3D structure of biologically-produced bacteriocins, determines sensing of specific bacterial receptors and their specific antimicrobial activity and that for some, not all, sensitive bacteria larger concentrations of synthetic peptides are needed to reach the activity of the bacteriocin-derived chimeras, produced by *P. pastoris*. Chemically synthesized bacteriocins have been designed to determine their mode of action and bacterial resistance (Fimland et al., 1996; Corbier et al., 2001; Ovchinnikov et al., 2014). Synthetic bacteriocin chimeras, designed from bacteriocins pediocin PA-1 and enterocin E50-52, showed reduced minimal inhibitory concentrations (MIC) than their native synthetic counterparts (Tiwari et al., 2015). However, further investigations would be performed for a deeper evaluation of the antimicrobial activity and mode of action of biologically-produced bacteriocins by recombinant hosts as compared to their synthetic analogs.

The results obtained in this study suggest that the N-terminal region of EntA and EntP seems to drive the processing and secretion of bacteriocin-derived chimeras, designed from fusion of N-terminal region of these bacteriocins to the C-terminal end of EntHF and EntCRL35 whereas the C-terminal region of EntHF and EntCR35, determines the antimicrobial activity of the corresponding biologically-produced chimeras (Table 5). However, further studies are needed to best unravel the influence of the N-terminal region of EntA and EntP in the production, secretion and expression of novel bacteriocin-derived chimeras. The evaluation of renew procedures for purification or concentration of bacteriocins from supernatants of the producer hosts is also needed. Bioengineered bacteriocins with enhanced antimicrobial activity, antimicrobial spectra and overproduced by suitable heterologous hosts are a challenge and a need for evaluation of the bacteriocins as natural antimicrobial agents in food, animal husbandry and medicine. The development of novel cloning vectors and the evaluation of different prokaryotic and eukaryotic expression platforms must be also explored.

## VII.6 ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dolores Gutiérrez and Inés Zapico from Unidad de Proteómica, Parque Científico de Madrid, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (UCM), for their technical assistance on MRM experiments.

## VII.7 REFERENCES

- Acuña, L., Morero, R.D., Bellomio, A., 2010. Development of wide-spectrum hybrid bacteriocins for food biopreservation. *Food Bioprocess Technol.* 4, 1029–1049.
- Acuña, L., Picariello, G., Sesma, F., Morero, R.D., Bellomio, A., 2012. A new hybrid bacteriocin, Ent35-MccV, displays antimicrobial activity against pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria. *FEBS Open Bio* 2, 12–19.
- Arbulu, S., Lohans, C.T., van Belkum, M.J., Cintas, L.M., Herranz, C., Vederas, J.C., Hernández, P.E., 2015a. Solution structure of enterocin HF, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* M3K31. *J. Agric. Food Chem.* 63, 10689–10695.
- Arbulu, S., Jiménez, J.J., Gútiérrez, L., Cintas, L.M., Herranz, C., Hernández, P.E. 2015b. Cloning and expression of synthetic genes encoding the broad antimicrobial spectrum bacteriocins SRCAM 602, OR-7, E-760, and L-1077, by recombinant *Pichia pastoris*. *BioMed Res. Int.* 2015, e767183.
- Birri, D.J., Brede, D.A., Forberg, T., Holo, H., Nes, I.F. 2010. Molecular and genetic characterization of a novel bacteriocin locus in *Enterococcus avium* isolates from infants. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 483–492.
- Borrero, J., Jiménez, J.J., Gútiérrez, L., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E. 2011a. Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 156, 76–86.
- Borrero, J., Brede, D.A., Skaugen, M., Diep, D.B., Herranz, C., Nes, I.F., Cintas, L.M., Hernández, P.E. 2011b. Characterization of garvicin ML, a novel circular bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 369–373.
- Borrero, J., Kunze, G., Jiménez, J.J., Böer, E., Gútiérrez, L., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2012. Cloning, production, and functional expression of the bacteriocin enterocin A, produced by *Enterococcus faecium* T136, by the yeasts *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, and *Arxula adeninivorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5956–5961.
- Butt, T.R., Edavettal, S.C., Hall, J.P., Mattern, M.R., 2005. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr. Purif.* 43, 1–9.
- Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernández, P.E., Holo, H., 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiol. Read. Engl.* 143 ( Pt 7), 2287–2294.
- Cavera, V.L., Arthur, T.D., Hashtanov, D., Chikindas, M.L. 2015. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 46, 494–501.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Håvarstein, L.S., Hernández, P.E., Nes, I.F., 1997. Biochemical and

- genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. Appl. Environ. Microbiol. 63, 4321–4330.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Håvarstein, L.S., Holo, H., Hernández, P.E., Nes, I.F., 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. J. Bacteriol. 182, 6806–6814.
- Cintas, L.M., Herranz, C., Hernández, P.E., 2011. Natural and heterologous production of bacteriocins, in: Drider, D., Rebuffat, S. (Eds.), Prokaryotic Antimicrobial Peptides. Springer New York, pp. 115–143.
- Corbier, C., Krier, F., Mulliert, G., Vitoux, B., Revol-Junelles, A.-M., 2001. Biological activities and structural properties of the atypical bacteriocins mesenterocin 52B and leucocin B-TA33a. Appl. Environ. Microbiol. 67, 1418–1422.
- Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R.P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nat. Rev. Microbiol. 3, 777–788.
- Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C., 2013. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? Nat. Rev. Microbiol. 11, 95–105.
- Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J., Higgins, D.R., 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. Mol. Biotechnol. 16, 23–52.
- DeLano W.L., 2002. The PyMOL molecular graphics system. DeLano Scientific, San Carlos, CA.
- Diep, D.B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., Nes, I.F., 2007. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. Proc. Natl. Acad. Sci. 104, 2384–2389.
- Drider, D., Rebuffat, S., 2011. Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications. Springer Science & Business Media.
- Feng, G., Guron, G.K.P., Churey, J.J., Worobo, R.W. 2009. Characterization of mundticin L, a class IIa anti-*Listeria* bacteriocin from *Enterococcus mundtii* CUGF08. Appl. Environ. Microbiol. 75, 5708–5713.
- Field, D., Connor, P.M.O., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2008. The generation of nisin variants with enhanced activity against specific Gram-positive pathogens. Mol. Microbiol. 69, 218–230.
- Fimland, G., Blingsmo, O.R., Sletten, K., Jung, G., Nes, I.F., Nissen-Meyer, J., 1996. New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins: the C-terminal region is important for determining specificity. Appl. Environ. Microbiol. 62, 3313–3318.
- Fimland, G., Johnsen, L., Dalhus, B., Nissen-Meyer, J., 2005. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc. 11, 688–696.
- Gasser, B., Saloheimo, M., Rinas, U., Dragosits, M., E. Rodríguez-Carmona, K. Baumann, M. Giuliani, E. Parrilli, P. Branduardi, C. Lang, D. Porro, P. Ferrer, M.L. Tutino, D. Mattanovich, Villaverde, A. 2008. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. Microb. Cell Fact.

- 7:11.
- Gutiérrez, J., Criado, R., Martín, M., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2005. Production of enterocin P, an antilisterial pediocin-like bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13, in *Pichia pastoris*. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 3004–3008.
- Jiménez, J.J., Borrero, J., Diep, D.B., Gútiéz, L., Nes, I.F., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E. 2013. Cloning, production, and functional expression of the bacteriocin sakacin A (SakA) and two SakA-derived chimeras in lactic acid bacteria (LAB) and the yeasts *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 40, 977–993.
- Jiménez, J.J., Borrero, J., Gútiéz, L., Arbulu, S., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2014. Use of synthetic genes for cloning, production and functional expression of the bacteriocins enterocin A and bacteriocin E 50-52 by *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. Mol. Biotechnol. 56, 571–583.
- Jiménez, J.J., Diep, D.B., Borrero, J., Gútiéz, L., Arbulu, S., Nes, I.F., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2015. Cloning strategies for heterologous expression of the bacteriocin enterocin A by *Lactobacillus sakei* Lb790, *Lb. plantarum* NC8 and *Lb. casei* CECT475. Microb. Cell Factories 14, 166.
- Johnsen, L., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., 2005. The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. J. Biol. Chem. 280, 9243–9250.
- Kawamoto, S., Shima, J., Sato, R., Eguchi, T., Ohmomo, S., Shibato, J., Horikoshi, N., Takeshita, K., Sameshima, T. 2002. Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. Appl. Environ. Microbiol. 68, 3830–3840.
- Kjos, M., Salehian, Z., Nes, I.F., Diep, D.B., 2010. An extracellular loop of the mannose phosphotransferase system component IIC is responsible for specific targeting by class IIa bacteriocins. J. Bacteriol. 192, 5906–5913.
- Kjos, M., Borrero, J., Opsata, M., Birri, D.J., Holo, H., Cintas, L.M., Snipen, L., Hernández, P.E., Nes, I.F., Diep, D.B. 2011. Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. Microbiology 157: 3256–3267.
- Li, J.F., Zhang, J., Zhang, Z., Ma, H.W., Zhang, J.X., Zhang, S.Q., 2010. Production of bioactive human beta-defensin-4 in *Escherichia coli* using SUMO fusion partner. Protein J. 29, 314–319.
- Lohans, C.T., Vederas, J.C. 2012. development of class IIa bacteriocins as therapeutic agents. Int. J. Microbiol., vol. 2012, article ID 386410.
- Love, K.R., Politano, T.J., Panagiotou, V., Jiang, B., Stadheim, T.A., Love, C.J. 2012. Systematic single-cell analysis of *Pichia pastoris* reveals secretory capacity limits productivity. PLoS ONE, 7 (6):e37915.
- MacLean, B., Tomazela, D.M., Shulman, N., Chambers, M., Finney, G.L., Frewen, B., Kern, R., Tabb, D.L., Liebler, D.C., MacCoss, M.J., 2010. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. Bioinforma. Oxf. Engl. 26, 966–968.

- Malmström, J., Lee, H., Aebersold R. 2007. Advances in proteomic workflows for systems biology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 378-384.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Holo, H., 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* 189, 1189–1198.
- Ni, Z., Zhou, X., Sun, X., Wang, Y., Zhang, Y. 2008. Decrease of hirudin degradation by deleting the *KEX1* gene in recombinant *Pichia pastoris*. *Yeast* 25, 1-8.
- Nissen-Meyer, J., Rogne, P., Oppegård, C., Haugen, H.S., Kristiansen, P.E., 2009. Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10, 19–37.
- Öberg, F., Sjöhamn, J., Conner, M.T., Bill, R.M., Hedfalk, K. 2011. Improving recombinant eukaryotic membrane protein yields in *Pichia pastoris*: the importance of codon optimization and clone selection. *Mol. Memb. Biol.* 28, 398–411.
- O'Connor, P.M., Ross, R.P., Hill, C., Cotter, P.D. 2015. Antimicrobial antagonists against food pathogens: a bacteriocin perspective. *Curr. Opin. Food Sci.* 2, 51-57.
- Ovchinnikov, K.V., Kristiansen, P.E., Uzelac, G., Topisirovic, L., Kojic, M., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Diep, D.B., 2014. Defining the structure and receptor binding domain of the leaderless bacteriocin LsbB. *J. Biol. Chem.* 289, 23838–23845.
- Papo, N., Oren, Z., Pag, U., Sahl, H.-G., Shai, Y., 2002. The consequence of sequence alteration of an amphipathic alpha-helical antimicrobial peptide and its diastereomers. *J. Biol. Chem.* 277, 33913–33921.
- Roy, A., Kucukural, A., Zhang, Y., 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* 5, 725–738.
- Saavedra, L., Minahk, C., de Ruiz Holgado, A.P., Sesma, F. 2004. Enhancement of the enterocin CRL35 activity by a synthetic peptide derived from the NH<sub>2</sub>-terminal sequence. *Antimicrob Agents Chemother.* 48, 2778-2781.
- Salvucci, E., Saavedra, L., Hebert, E.M., Haro, C., Sesma, F. 2012. Enterocin CRL35 inhibits *Listeria monocytogenes* in a murine model. *Foodborne Pathog. Dis.* 9, 68-74.
- O'Connor, P. M.; Ross, R. P.; Hill, C.; Cotter, P. D. 2015. Antimicrobial antagonists against food pathogens: a bacteriocin perspective. *Curr. Opin. Food Sci.*, 2, 51-57.
- Sánchez, J., Borrero, J., Gómez-Sala, B., Basanta, A., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2008. Cloning and heterologous production of hiracin JM79, a Sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, in lactic acid bacteria and *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2471–2479.
- Stolz, A., Wolf, D.H. 2010. Endoplasmic reticulum associated protein degradation: a chaperone assisted journey to hell. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 694–705.
- Tiwari, S.K., Sutyak Noll, K., Cavera, V.L., Chikindas, M.L., 2015. Improved antimicrobial activities of synthetic-hybrid bacteriocins designed from enterocin E50-52 and pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1661–1667.
- Wang, Y., Henz, M.E., Gallagher, N.L., Chai, S., Gibbs, A.C., Yan, L.Z., Stiles, M.E., Wishart, D.S., Vederas, J.C., 1999. Solution structure of carnobacteriocin B2 and implications for structure-activity relationships among type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochem.* 38, 15438–15447.
- Wang, X.J., Wang, X.M., Teng, D., Zhang, Y., Mao, R.Y., Wang, J.H., 2014. Recombinant production of the antimicrobial peptide NZ17074 in *Pichia pastoris* using SUMO3 as a

- fusion partner. Lett. Appl. Microbiol. 59, 71–78.
- Weinacker, D., Rabert, C., Zepeda, A.B., Figueroa, C.A., Pessoa, A., Farías, J.G., 2014. Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. Braz. J. Microbiol. 44, 1043–1048.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y., 2015. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. Nat. Methods 12, 7–8. doi:10.1038/nmeth.3213.
- Yang, S., Kuang, Y., Li, H., Liu, Y., Hui, X., Li, P., Jiang, Z., Zhou, Y., Wang, Y., Xu, A., Li, S., Liu, P., Wu, D. 2013. Enhanced production of recombinant secretory proteins in *Pichia pastoris* by optimizing Kex2 P1' site. PLoS ONE 8 (9):e75347.
- Yocum, A., Chinnayian, A.M. 2009. Current affairs in quantitative targeted proteomics: multiple reaction monitoring-mass spectrometry. Brief. Funct. Genom. Proteom. 8, 145–157.
- Yuan, J., Zhang, Z.-Z., Chen, X.-Z., Yang, W., Huan, L.-D., 2004. Site-directed mutagenesis of the hinge region of nisinZ and properties of nisinZ mutants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64, 806–815.
- Zhang, C., He, X., Gu, Y., Zhou, H., Cao, J., Gao, Q., 2014. Recombinant scorpine produced using SUMO fusion partner in *Escherichia coli* has the activities against clinically isolated bacteria and inhibits the *Plasmodium falciparum* parasitemia in vitro. PLoS ONE 9, e103456.
- Zhang, Y., 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. BMC Bioinformatics 9, 40.
- Zhao, Y., Jensen, O.N. 2009. Modification-specific proteomics: strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques. Proteomics 9, 4632–4641.

# CAPÍTULO *CHAPTER*

VIII

**CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES SINTÉTICOS QUE  
CODIFICAN PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (PAMs)  
NATIVOS, PÉPTIDOS HÍBRIDOS Y BACTERIOCINAS-  
PAMs QUIMERAS, POR *Pichia pastoris***

---

***CLONING AND EXPRESSION OF SYNTHETIC GENES  
ENCODING NATIVE ANTIMICROBIAL PEPTIDES (AMPS),  
HYBRID PEPTIDES AND BACTERIOCIN-AMPS-DERIVED  
CHIMERAS, BY RECOMBINANT *Pichia pastoris****





### VIII.1. ABSTRACT

Synthetic genes designed from (a), the mature amino acid sequence of the antimicrobial peptides (AMPs) microcin V (MccV), human  $\beta$ -defensin 3 (HBD-3), a derived peptide from chicken cathelicidin 2 (dCATH-2) and pleurocidin WF (PleWF), (b) from hybrid peptides derived from fusion of mature enterocin A (EntA) to mature MccV, HBD-3, dCATH-2 and PleWF through a tri-glycine peptide linker, and (c) from bacteriocin-AMPs-derived chimeras derived from fusion of the N-terminal region of EntA to mature MccV, HBD-3, dCATH-2 and PleWF, were cloned into the protein expression vector pPICZ $\alpha$ A for transformation into *P. pastoris* X-33. None of the *P. pastoris* recombinants, encoding native AMPs and hybrid peptides, showed direct antimicrobial activity and only *P. pastoris*, encoding the EntA::HBD-3 chimera, showed antimicrobial activity when transformants were screened by a streak-on-agar test (SOAT). Nevertheless, eluted fractions from purified supernatants of recombinant *P. pastoris*, producers of mature AMPs and hybrid peptides, showed antimicrobial activity. The antimicrobial activity recovered from the supernatant of *P. pastoris*, producer of the EntA::L::MccV, was larger than that of the rest of the recombinant yeast producers. However, MALDI-TOF MS analysis of the purified fractions did not reveal the presence of the cloned peptides in the samples. The results of this preliminary study suggest that the N-terminal region of EntA seems to drive the processing and secretion of hybrid peptides. However, further experiments are needed to best unravel the influence of the N-terminal region of EntA in the production, secretion, purification and functional expression of the novel bacteriocin-AMPs-derived chimeras EntA::MccV, EntA::HBD-3, EntA::dCATH-2 and EntA::PleWF.

### VIII.2. INTRODUCTION

Antimicrobial peptides (AMPs), also termed host defense peptides (HDPs) are gene-encoded natural antimicrobial peptides, that have gained attention in the search for new antimicrobials to combat infectious diseases. They have been identified and isolated from most eukaryotic life forms, constituting a first line of defense against invading pathogens (Reddy et al., 2004). Because many AMPs usually kill microbes by disruption of membrane integrity, a mechanism that is inherently more difficult to circumvent for microbes developing resistance, AMPs are being extensively evaluated as novel antimicrobial agents. However, for AMPs to become accessible for evaluation further research efforts should overcome the shortcomings for their production in larger amounts. Of interest would be the production of native or modified peptides with the desired antimicrobial activity and antimicrobial spectra, by heterologous microbial producers.

Generally, AMPs are small (<10 kDa), cationic, amphipathic peptides often classified based on structure and with multiple biological activities including antimicrobial, antifungal, antiviral and immunomodulatory properties. In eukaryotes, the major AMPs classes include the disulfide-stabilized defensins and the  $\alpha$ -helical cathelicidins with broad antimicrobial spectra (Conde et al., 2012). In prokaryotes, the main AMPs include the bacteriocins produced by Gram positive bacteria and the colicins and microcins, produced by *E. coli* and other Enterobacteriaceae (Drider and Rebuffat, 2011).

In mammals, defensins and cathelicidins are the main produced AMPs. Human beta defensin 3 (HBD-3) is of interest because it shows antimicrobial activity towards Gram-positive and Gram-negative bacteria (Dhople et al., 2006). HBD-3 is a 45-residue, cationic peptide with an asymmetrical distribution of charged residues, mostly clustered at the C-terminal end and with six cysteines, typical of the human  $\beta$ -defensins with low sequence similarity among them. Cathelicidins also exhibit broad range of antibacterial activity, as well as antagonism against fungi and parasites (Kościuczuk et al., 2012). The chicken cathelicidin 2 (dCATH-2)-derived peptide contains the N-terminal sequence of 15 amino acids of CATH-2 where the three phenylalanines have been replaced by tryptophans. This modified dCATH-2 was shown to display improved antimicrobial activity compared to the wild peptide (Molhoek et al., 2010). Pleurocidins are a family of  $\alpha$ -helical cationic antimicrobial peptides with similar structural and functional characteristics as the cathelicidins. The winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) pleurocidin (PleWF) is a 25 amino acid linear peptide with broad antimicrobial spectrum (Cole et al., 1997; Burrowes et al., 2005).

In prokaryotes, the bacteriocins produced by lactic acid bacteria (LAB) attract considerable interest primarily as natural and nontoxic food preservatives (O'Connor et al., 2015), but also for their potential application as therapeutic antimicrobial agents for human and veterinary applications and in the animal production field (Arbulu et al., 2015). They are generally divided into two main classes: class I or lantibiotics, characterized by post-translationally modified lanthionine residues and class II bacteriocins with unmodified amino acids. The class II bacteriocins may be further subdivided into the pediocin-like (class IIa) bacteriocins, the two-peptide (class IIb) bacteriocins, the cyclic (class IIc) bacteriocins, and the non-pediocin-like one peptide linear (class IId) bacteriocins (Cotter et al., 2005; Nes et al., 2014). Among the class IIa bacteriocins, the highly antilisterial enterocin A (EntA) has been greatly evaluated concerning heterologous production by microbial hosts including LAB (Martín et al., 2007; Borrero et al., 2011a; Jiménez et al., 2014) and yeasts (Borrero et al., 2012; Jiménez et al., 2015). Microcin V (MccV), previously named colicin V, is a colicin produced by *E. coli* active against close Gram-negative bacteria and synthesized as a precursor peptide of 103 amino acid residues. It contains a 15 amino acids N-terminal double glycine leader peptide that is cleaved off during export to generate the mature MccV form of 88 amino acids (Fath et al., 1994; Håvarstein et al., 1994; McCormick et al., 1999).

In this work, *P. pastoris* X-33 has been evaluated as heterologous microbial host for cloning and expression of synthetic genes encoding mature microcin V (MccV) (Fath et al., 1994), the human beta-defensin 3 (HBD-3) (Dhople et al., 2006), a chicken cathelicidin 2-derived peptide (dCATH-2) (Molhoek et al., 2010) and a pleurocidin from winter flounder (*P. americanus*) (PleWF) (Cole et al., 1997). We also report the design of synthetic genes encoding hybrid peptides derived from the bacteriocin enterocin A (EntA) (Casaus et al., 1997) fused to MccA (EntA::L::MccA), HBD-3 (EntA::L::HBD-3), dCATH-2 (EntA::L::dCATH-2) and PleWF (EntA::L::PleWF), respectively, including the L (3 amino acid Gly-Gly-Gly) linker. Synthetic genes were also designed encoding the bacteriocin-AMPs-derived chimeras EntA::MccV, EntA::HBD-3, EntA::dCATH-2, and EntA::PleWF. Synthetic genes encoding native, hybrid peptides and bacteriocin-AMPs-derived chimeras

with adapted codon usage for expression by *P. pastoris*, were cloned into the pPICZ $\alpha$ A expression vector for evaluation of their expression by recombinant *P. pastoris* X-33.

### VIII.3. MATERIALS AND METHODS

#### VIII.3.1. Microbial strains

*Pediococcus damnosus* CECT4797 (Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, Spain) was grown in MRS broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) at 32°C. *Escherichia coli* JM109 (Promega, WI, USA) was grown in LB broth (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, USA) at 37°C with shaking (250 rpm). *P. pastoris* X-33 (Invitrogen S.A., Barcelona, Spain) was cultured in YPD medium (Sigma-Aldrich) at 30°C with shaking (200-250 rpm). Zeocin (Invitrogen) was added when needed at concentrations of 25, 100 or 1,000  $\mu$ g/mL.

#### VIII.3.2 Basic genetic techniques and enzymes

The known amino acid sequences of mature EntA, MccV, HBD-3, dCATH-2 and PleWF were used for design of synthetic genes encoding these mature antimicrobial peptides as well as the hybrid peptides EntA::L::MccA, EntA::L::HBD-3, EntA::L::dCATH-2, EntA::L::PleWF and the bacteriocin-AMPs-derived chimeras EntA::MccV, EntA::HBD-3, EntA::dCATH-2 and EntA::PleWF (Table 1). All synthetic genes, encoded in pMAT-derived plasmids (Table 2), contained a 5'-nucleotide appendix including the *Xho*I restriction site (GAATTCTCGAGAAAAGA) and a 3'-nucleotide appendix including the termination codon TAAGGG and the *Not*I restriction site (TAAGGGAAGGTCGAAGCGGCCGCAACGAT). GeneArt® was the supplier of synthetic genes (GeneArt® Life Technologies, Paisley, UK) and New England BioLabs, Ipswich, MA, (USA) the supplier of the DNA restriction enzymes. Ligations were performed with the T4 DNA ligase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). *E. coli* JM109 cells were transformed as described by the supplier and competent *P. pastoris* X-33 cells were also obtained as recommended by the supplier. Electrocompetent cells were transformed with a Gene Pulser™ and Pulse Controller apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The *P. pastoris* expression vector pICZ $\alpha$ A was obtained from Invitrogen.

**Table 1. Amino acid sequence of native antimicrobial peptides (AMPs), hybrid peptides and bacteriocin-AMPs-derived chimeras included in this study**

AMPs, hybrid peptides and bacteriocin-AMPs-derived chimeras	Amino acid sequence	Length (aa)	Deduced molecular mass (Da)
EntA	TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDWAKATTTCIAGMSIGGFLGGAIPGKC	47	4,832.5
MccV	ASGRDIAMAIGTLSGQFVAGGIGAAAGGVAGGAIYDYASTHKPNPAMSPSGLGGTIKQKPEGIPSEAWNYAAGRCLNWSNNLSDVCL	88	8,735.8
HBD-3	GIINTLQKYYCRVRGGRCVLSCLPKEEQIGKCSTRGRKCCRRKK	45	5,161.2
dCATH-2 <sup>a</sup>	RWGRWLRKIRRWRPK	15	2,150.6
PleWF	GWGSFFKKAHVKGKHAALHYL	25	2,711.1
EntA::L::MccV	TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDWAKATTTCIAGMSIGGFLGGAIPGKC <b>GGG</b> ASGRDIAMAIGTLSGQFVAGGIGAAAGGVAGGAIYDYASTHKPNPAMSPSGLGGTIKQKPEGIPSEAWNYAAGRCLNWSNNLSDVCL	138	13,721.5
EntA::L::HBD-3	TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDWAKATTTCIAGMSIGGFLGGAIPGKC <b>GGG</b> GIINTLQKYYCRVRGGRCVLSCLPKEEQIGKCSTRGRKCCRRKK	95	10,146.9
EntA::L::dCATH-2	TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDWAKATTTCIAGMSIGGFLGGAIPGKC <b>GGG</b> RWGRWLRKIRRWRPK	65	7,136.3
EntA::L::PleWF	TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDWAKATTTCIAGMSIGGFLGGAIPGKC <b>GGG</b> GWGSFFKKAHVKGKHAALHYL	75	
EntA::MccV	<b>TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDW</b> ASGRDIAMAIGTLSGQFVAGGIGAAAGGVAGGAIYDYASTHKPNPAMSPSGLGGTIKQKPEGIPSEAWNYAAGRCLNWSNNLSDVCL	111	11,343.7
EntA::HBD-3	<b>TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDW</b> GIINTLQKYYCRVRGGRCVLSCLPKEEQIGKCSTRGRKCCRRKK	68	7,769.0

EntA::dCATH-2	<b>TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVD</b> WRWGRWLRKIRRWRPkgWGSFFKKAAHVGK HVGKAALTHYL	63	7,451.6
EntA::PleWF	<b>TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVD</b> WGWGSFFKKAAHVGKHVGKAALTHYL	23	5,319.0

---

<sup>a</sup> dCATH-2<sub>(F2,5,12→W)</sub>, chicken cathelicidin 2 (C1-C15) derived peptide where phenylalanines have been replaced by tryptophans.

\* The linker peptide highlighted. EntA: enterocin A; MccV: microcin V; HBD-3: human beta-defensin 3; dCATH-2, derived chicken cathelicidin 2; PleWF: winter flounder pleurocidin; L: tripeptide (GGG) linker.

- In bold, the N-terminal region of EntA fused to the antimicrobial peptides (AMPs).

**Table 2. Plasmids used in this study**

Plasmids	Description <sup>a</sup>	Source and/or reference <sup>b</sup>
pPICZαA	Zeo <sup>r</sup> ; integrative plasmid carrying the secretion signal sequence from the <i>S. cerevisiae</i> α-factor prepropeptide and functional sites for integration at the 5' AOX1 locus of <i>P. pastoris</i> X-33	Invitrogen Life Technologies
pMATEntA::L::MccV	Amp <sup>r</sup> ; pMAT plasmid carrying the <i>entA::cvaC</i> synthetic gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	GeneArt® Life Technologies
pMATEntA::L::HBD-3	Amp <sup>r</sup> ; pMAT plasmid carrying the <i>entA::L::DEFB103</i> synthetic gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	GeneArt® Life Technologies
pMATEntA::L::dCATH-2	Amp <sup>r</sup> ; pMAT plasmid carrying the <i>entA::L::CATHL2</i> synthetic gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	GeneArt® Life Technologies
pMATEntA::L::PleWF	Amp <sup>r</sup> ; pMAT plasmid carrying the <i>entA::L::ple1</i> synthetic gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	GeneArt® Life Technologies
pMATEntA::MccV	Amp <sup>r</sup> ; pMA plasmid carrying the <i>entA::cvaC</i> synthetic gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	GeneArt® Life Technologies
pMATEntA::HBD-3	Amp <sup>r</sup> ; pMAT plasmid carrying the <i>entA::DEFB103</i> synthetic gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	GeneArt® Life Technologies
pMATEntA::dCATH-2	Amp <sup>r</sup> ; pMAT plasmid carrying the hybrid <i>entA::CATHL2</i> synthetic gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	GeneArt® Life Technologies
pMATEntA::PleWF	Amp <sup>r</sup> ; pMAT plasmid carrying the hybrid <i>entA::ple1</i> synthetic gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	GeneArt® Life Technologies
pMccV	pPICZαA derivative with the <i>cvaC</i> synthetic gene	This work
pHBD-3	pPICZαA derivative with the <i>DEFB103</i> synthetic gene	This work
pCATH2	pPICZαA derivative with the <i>CATHL2</i> synthetic gene	This work
pPleWF	pPICZαA derivative with the <i>ple1</i> synthetic gene	This work
pEntA::L::MccV	pPICZαA derivative with the <i>entA::L::cvaC</i> synthetic gene	This work

pEntA::L::HBD3	pPICZ $\alpha$ A derivative with the <i>entA::L::DEFB103</i> synthetic gene	This work
pEntA::L::CATH2	pPICZ $\alpha$ A derivative with the <i>entA::L::CATHL2</i> synthetic gene	This work
pEntA::L::PleWF	pPICZ $\alpha$ A derivative with the <i>entA::L::ple1</i> synthetic gene	This work
pEntA::MccV	pPICZ $\alpha$ A derivative with the <i>entA::cvaC</i> synthetic gene	This work
pEntA::H $\beta$ D3	pPICZ $\alpha$ A derivative with the <i>entA::DEFB103</i> synthetic gene	This work
pEntA::CATH2	pPICZ $\alpha$ A derivative with the <i>entA::CATHL2</i> synthetic gene	This work
pEntA::PleWF	pPICZ $\alpha$ A derivative with the <i>entA::ple1</i> synthetic gene	This work

<sup>a</sup> Amp<sup>r</sup>, ampicilin resistance; Zeo<sup>r</sup>, zeocin resistance.

### VIII.3.3. PCR amplification and oligonucleotide sequencing

Oligonucleotide primers were obtained from Sigma-Genosys Ltd., Cambridge, (UK). PCR amplifications were performed in 50  $\mu$ L reaction mixtures containing 1  $\mu$ L of purified DNA, 70 pmol of each primer and 1 U of Velocity DNA Polymerase (Bioline, London, UK) in a DNA thermal cycler Techgene (Techne, Cambridge, UK). The PCR-generated fragments were purified by a NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co., Düren, Germany) for cloning and nucleotide sequencing. When needed, nucleotide sequencing of the purified PCR products was performed using the ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>TM</sup> Terminator cycle sequence reaction kit and the automatic DNA sequencer ABI PRISM, model 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), at the Unidad de Genómica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Madrid, Spain.

### VIII.3.4. Cloning of synthetic genes encoding native, hybrid peptides and bacteriocin-AMPs-derived chimeras in the pPICZ $\alpha$ A protein expression vector

The primers and inserts used for construction of the recombinant pPICZ $\alpha$ A plasmids are listed in Table 3. Nucleotide fragments were in frame with the *S. cerevisiae*  $\alpha$ -factor secretion signal, without the Glu-Ala spacer adjacent to the Kex2 protease cleavage site, of the fused synthetic genes. Digestion of fragments with *Xho*I-*Not*I permitted ligation of the resulting R-fragments into pPICZ $\alpha$ A, digested with the same enzymes, to generate the respective plasmid-derived vectors. Competent *E. coli* JM109 cells were used for cloning and vector propagation and the resulting transformants were confirmed by PCR amplification and sequencing of the inserts. Subsequently, the *Sac*I-linearized vectors were transformed into competent *P. pastoris* X-33 that, after growth on YPD agar supplemented with zeocin (100 and 1,000  $\mu$ g/mL) and sorbitol (1



M), yielded the corresponding zeocin-resistant derivatives. PCR and DNA sequencing of the inserts confirmed the presence of the cloned synthetic genes in the transformed yeast cells. *P. pastoris* X-33 and *P. pastoris* X-33 (pPICZαA) were used as bacteriocin-negative controls, to discard the possibility that the antimicrobial activity was due to yeast metabolites other than bacteriocins.

**Table 3. Primers and PCR products used in this work**

	Nucleotide sequence (5'-3') or description	Amplifications
<b>Primers</b>		
MccV-F	TTATTCAACTCGAGAAAAGAGCTTCTGGTAGAGACATTGCTATGGC	R-MccV
HBD3-F	TTATTCAACTCGAGAAAAGAGGTATCATCAACACATTGCAGAAGTAC	R-HBD3
PleWF-F	TTATTCAACTCGAGAAAAGAGGTTGGGGTTCATTCTTCAAGAAAGCTGCTC	R-PleWF
CATH2-F	TTATTCAACTCGAGAAAAGAAGATGGGGAAGATGGTTGAGAAAGATC	R-CATH2
S071-F	GTCCAGAGCTCGAATTCTCGAGAAAAG	R-EA::MccV, R-EA::HBD3, R-EA::PleWF, R-EA::CATH2, R-EA::L::MccV, R-EA::L::HBD3, R-EA::L::CATH2, R-EA::L::PleWF,
AMP-R	GAGGCCAGTCTTGTGCTCCAGG	R-MccV, R-HBD3, R-PleWF, R-CATH2, R-EA::L::MccV, R-EA::L::HBD3, R-EA::L::CATH2, R-EA::L::PleWF
PHFCRL-R	CCATGAGGCCAGTCTTGTGC	R-EA::MccV, R-EA::HBD3, R-EA::PleWF, R-EA::CATH2
ALFA-F	TACTATTGCCAGCATTGCTGC	pPICZαA amplification fragment including the cloned synthetic gene
3AOX1-R	GCAAATGGCATTCTGACATCC	pPICZαA amplification fragment including the cloned synthetic gene
<b>PCR products</b>		
R-MccV	334-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the α-factor Kex2 signal cleavage fused to the target gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	
R-HBD3	205-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the α-factor Kex2 signal cleavage fused to the target gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	
R-CATH2	89-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the α-factor Kex2 signal cleavage fused to the target gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	
R-PleWF	149-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the α-factor Kex2 signal cleavage fused to the target gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	
R-EA::MccV	424-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the α-factor Kex2 signal cleavage fused to the target gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage	

R-EA::HBD3	295-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to the target gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage
R-EA::CATH2	205-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to the target gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage and TAAGGG as stop codon
R-EA::PleWF	235-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to the target gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage
R-EA::L::MccV	498-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to the target gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage
R-EA::L::HBD3	359-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to the target gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage
R-EA::L::CATH2	279-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to the target gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage
R-EA::L::PleWF	309-bp <i>XhoI/NotI</i> fragment containing the $\alpha$ -factor Kex2 signal cleavage fused to the target gene with the <i>P. pastoris</i> codon usage

---

**VIII.3.5. Antimicrobial activity of the recombinant *P. pastoris* X-33-derived producers**

The antimicrobial activity of individual *P. pastoris* X-33 transformants was screened by a streak-on-agar test (SOAT), as previously described (Jiménez et al., 2014). Briefly, 55 colonies of *P. pastoris* X-33 recombinants encoding MccV, 60 colonies encoding HBD-3, 6 colonies encoding dCATH-2, 8 colonies encoding PleWF and 60 colonies each of *P. pastoris* X-33 recombinants encoding EntA::L::MccV, EntA::L::HBD-3, EntA::L::dCATH-2, EntA::L::PleWF, EntA::MccV, EntA::HBD-3, EntA::dCATH-2 and EntA::PleWF were streaked onto BMMY buffered methanol complex medium [1% yeast, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate (pH 6), 1.34% yeast nitrogen base (YNB) without amino acids,  $4 \times 10^{-5}$  % biotin, 0.5% methanol] agar and grown at 30°C during 0 to 96 h to induce production of the antimicrobial peptides. Pure methanol was added to a final concentration of 0.5% every 24 hours to maintain induction. After incubation of the plates, MRS soft-agar containing  $10^5$  cfu/mL of the indicator microorganism *P. damnosus* CECT4797 was added to the plates that were further incubated at 32°C for 24 h for visualization of halos of inhibition.

To evaluate growth of the recombinant yeasts and the antimicrobial activity of their supernatants, the *P. pastoris* X-33-derived bacteriocin producers were grown in the buffered glycerol complex medium BMGY [1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate (pH 6), 1.34% YNB without amino-acids,  $4 \times 10^{-5}$  % biotin, 1% glycerol] at 30°C, until an optical density at 600 nm (OD600) of, approximately, 2 to 6 was reached. Cells were then harvested by centrifugation ( $5,000 \times g$  at 4°C for 10 min), and resuspended to an OD600 of 1 in the BMMY medium. The *P. pastoris* cultures were incubated at 30°C for 96 h with shaking (250 rpm). During growth, samples were collected periodically for determination of their OD600 and the antimicrobial activity of their supernatants, by an agar well diffusion test (ADT) and a microtiter plate assay (MPA) (Cintas et al., 2000), using *P. damnosus* CECT4797 as the indicator microorganism. With the MPA, growth inhibition of the sensitive culture was measured spectrophotometrically at 620 nm with a microtitre Labsystems iEMS plate reader (Labsystems, Helsinki, Finland). One bacteriocin unit (BU) was defined as the reciprocal of the highest dilution of the bacteriocin causing 50% growth inhibition (50% of the turbidity of the control culture without bacteriocin).

**VIII.3.6. Purification of the antimicrobial activity of supernatants from the recombinant yeasts**

The antimicrobial activity of supernatants from recombinant *P. pastoris* X-33, was purified using a previously described procedure (Jiménez et al., 2014). Supernatants from stationary phase 0.5-L cultures of the recombinant yeasts, grown in BMMY buffered methanol complex medium at 30°C were precipitated with ammonium sulfate, desalted by gel filtration (PD-10 columns) and subjected to cation exchange- (SP Sepharose Fast Flow) followed by hydrophobic interaction- (Octyl Sepharose CL-4B) and reverse phase-chromatography in a Fast Protein Liquid Chromatography system (RP-FPLC) (GE Healthcare, Barcelona, Spain) using the SOURCE<sup>TM</sup> 5RPC ST 4.6/150 column (Ge, Healthcare). All chromatographic columns and

supporting gels were from GE Healthcare. The antimicrobial activity of purified fractions was evaluated against *P. damnosus* CECT4797, by using the MPA.

### VIII.3.7. Mass spectrometry (MS) analysis of the purified peptide fractions

Purified fractions from supernatants of *P. pastoris* X-33 producers of native antimicrobial peptides (AMPs) and hybrid peptides were subjected to matrix-assisted laser desorption–ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), at the Unidad de Proteómica, Universidad Complutense de Madrid (Madrid, Spain). Briefly, 1  $\mu$ L sample was spotted onto a MALDI target plate and allowed to air-dry at room temperature. Then, 0.4  $\mu$ L of a 3 mg/mL of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany) in 50% acetonitrile were added to the dried peptide to digest spots and allowed again to air-dry at room temperature. MALDI-TOF MS analyses were performed in a 4800 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA), operated in 1 KV reflector mode. All mass spectra were calibrated externally using a standard peptide mixture (AB Sciex, Foster City, CA, USA).

## VIII.4. RESULTS AND DISCUSSION

Antimicrobial peptides (AMPs) represent a naturally occurring defense mechanism and they are excellent candidates for the development of novel broad-spectrum antimicrobial agents (Bahar and Ren, 2013). In multicellular organisms, fungi (Mygind et al., 2005), plants (Tam et al., 2015) or insects (Bulet and Stöcklin, 2005; Yi et al., 2014) their AMPs, as well as defensins and cathelicidins from higher vertebrates (De Smet and Contreras, 2005), provide a protective response against infections and are a principal component of the innate immunity. In unicellular organisms, AMPs such as bacteriocins function to suppress bacterial competitor species (Duquesne et al., 2007; Drider and Rebuffat, 2011; Nes et al., 2014).

However, the production of large quantities of AMPs from bacteria and eukaryotic cells is still a tailback for their scientific and industrial development. The small quantity of peptides obtained from native producers and the high cost of large-scale peptide synthesis, drive the exploration of recombinant microbial systems for their production in larger amounts (Borrero et al., 2012; Mao et al., 2015). The heterologous production of AMPs, such as bacteriocins by yeasts have been shown advantages over those from bacterial cells (Borrero et al., 2012), while the use of synthetic genes is a useful tool when the sequence encoding the protein is not available or difficult to obtain (Jiménez et al., 2014). Moreover, the adaptation of codon usage for protein expression in yeasts also appears to enhance protein production since translation efficiency and transport across the endoplasmic reticulum (ER), are favoured (Ward et al., 2011; Gao et al., 2012).

Thus, of interest was to explore the potential of *P. pastoris* as producer of native, hybrid peptides and bacteriocin-derived chimeras from AMPs with described antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Currently reclassified as *Komagataella pastoris*, *P. pastoris* has been developed as a host for large-scale protein expression (Cregg et

al., 2000; Weinacker et al., 2014). In this study, besides interest in the production of the native AMPs MccV, HBD-3, dCATH-2 and PleWF the bacteriocin EntA was evaluated as a potential carrier peptide for production of hybrid peptides fused by a tripeptide (tri-Gly) linker, whereas the bacteriocin-AMPs-derived chimeras were designed from fusion of the N-terminal region of EntA (23 amino acid residues) to the mature MccV, HBD-3, dCATH-2 and PleWF (Table 1).

All constructed synthetic genes encoding the native AMPs, hybrid peptides and bacteriocin-AMPs-derived chimeras were cloned into pPICZ $\alpha$ A and the *SacI*-linearized vectors transformed into competent *P. pastoris* X-33, yielding zeocin-resistant recombinants encoding the target AMPs. However, recombinant yeasts encoding native and hybrid AMPs did not show antimicrobial activity when individual colonies were screened by a streak-on-agar test (SOAT). Only *P. pastoris* X-33EntA::HBD-3, encoding the EntA::HBD-3 chimera, showed a direct antimicrobial activity against *P. damnosus* CECT4797 by the SOAT (Figure 1). None of the other recombinant yeasts showed direct antimicrobial activity, even those selected for their high zeocin resistance (1,000  $\mu$ g/mL).



**Figure 1.** Antimicrobial activity of recombinant *P. pastoris* X-33EntA::HBD-3 by a streak-on-agar test (SOAT), during growth in BMMY buffered methanol complex medium. Active colonies are circled in blue.

When supernatants of *P. pastoris* recombinants, encoding mature AMPs and the hybrid peptides were purified by using a multistep chromatographic procedure, the eluted fractions from the last RP-FPLC step from some producers showed antimicrobial activity possibly due to removal of antimicrobial inhibitors, disaggregation of the peptides or changes of conformation of the AMPs in the hydrophobic solvent (Table 4). While interesting, this was not an unexpected observation since other studies have also reported an increase in the antimicrobial activity of eluted fractions after purification of the active molecules by using multiple chromatographic purification steps (Borrero et al., 2011b; Arbulu et al., 2015, Arbulu et al., unpublished results). The antimicrobial activity recovered from the supernatant of *P. pastoris* X-33, producer of the EntA::L::MccV, was larger than that of the rest of the recombinant *P. pastoris*. Nevertheless, of interest is the low or decreased antimicrobial activity observed after elution of supernatants from the different chromatographic columns and supporting gels (Table 4). Thus, a larger research work would be directed towards the design of novel and more effective chromatographic procedures for purification of novel

bioengineered AMPs peptides.

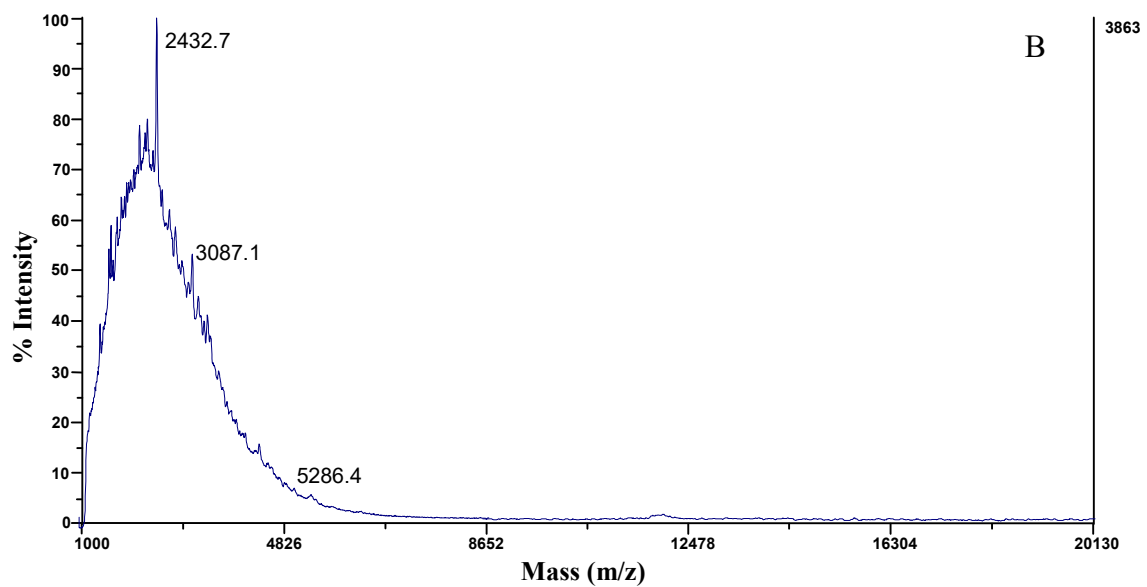
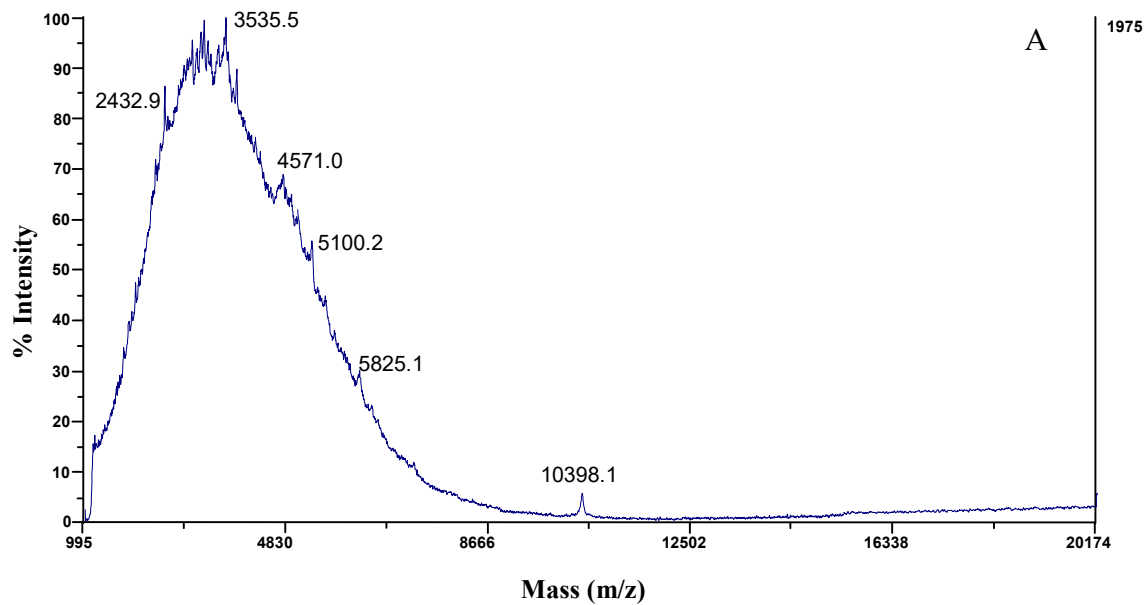
MALDI-TOF MS analysis of purified supernatants from recombinant *P. pastoris* with antimicrobial activity after the RP-FPLC step, mostly showed a large display of peptide fragments of different molecular mass than deduced from the calculated theoretical molecular mass of the cloned AMPs (Figure 2). The different molecular mass of the observed peptide fragments may suggest the existence of truncated bacteriocins, the interaction of bacteriocins with unknown biological compounds or the bacteriocins being subjected to post-translational modifications (Zhao and Jensen, 2009; Jiménez et al., 2013; Arbulu et al., 2015). However, it may also happen that due to low concentration of peptides in the extracts the MALDI-TOF MS analyses revealed unclear/poor MS spectra, and the hypothetically produced AMPs could not be detected.

**Table 4. Antimicrobial activity<sup>a</sup> of eluted fractions from purified supernatants of *P. pastoris* X-33 derivatives encoding native antimicrobial peptides (AMPs) and hybrid peptides**

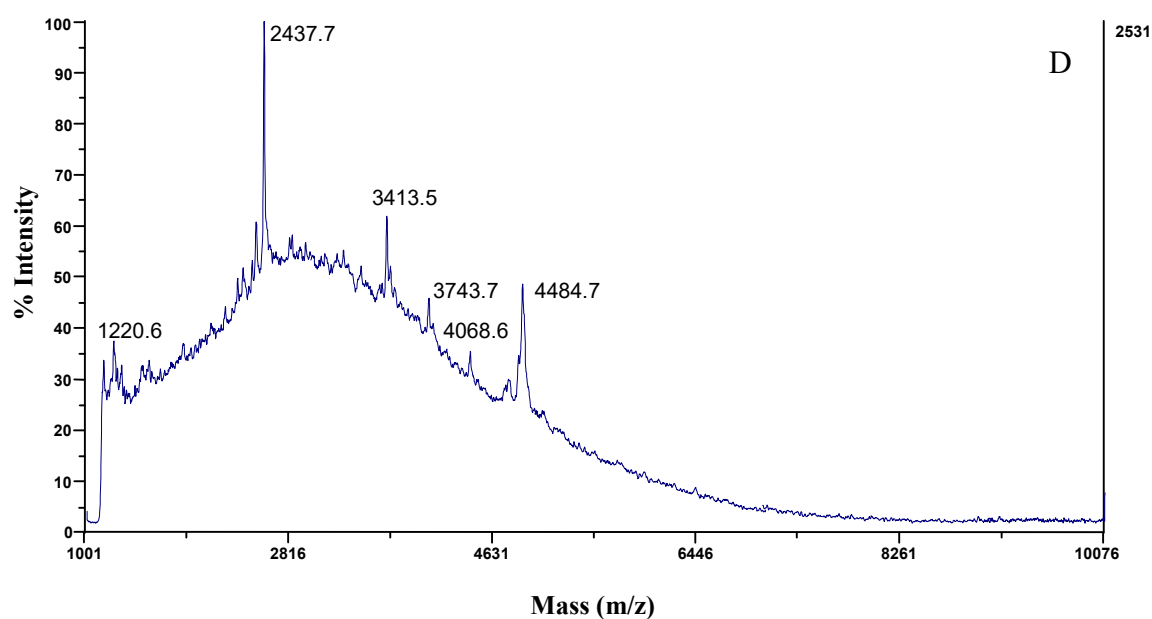
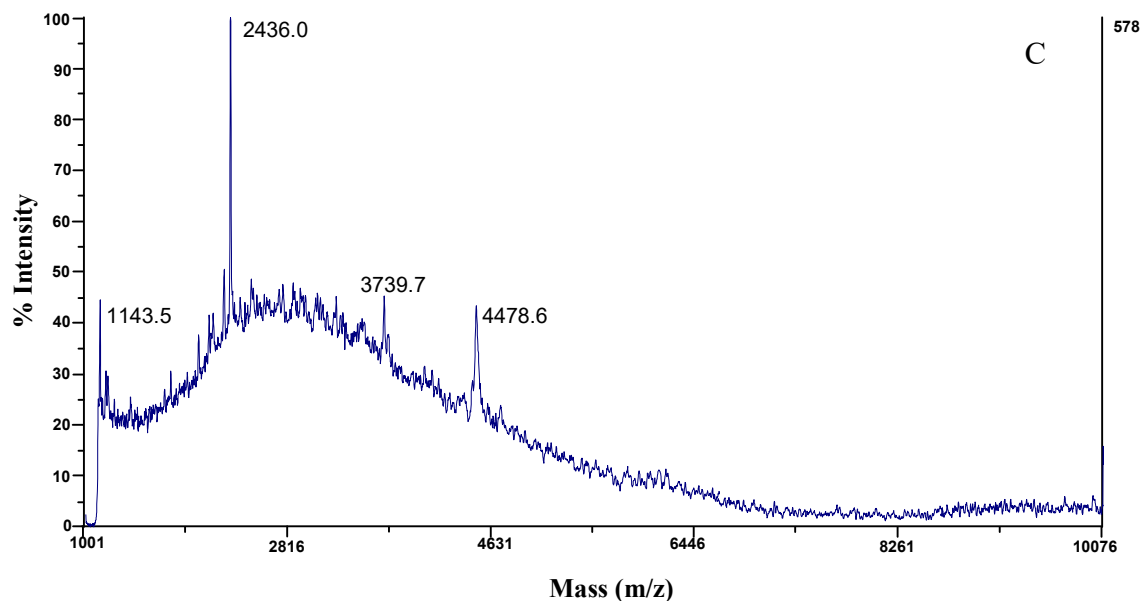
Strain	Antimicrobial activity (BU/mL) <sup>a</sup>					
	SN	AS	GF	SE	OE	RP-FPLC
<i>P. pastoris</i> X-33						
MccV	----	----	----	----	----	----
HBD-3	----	----	----	----	----	----
dCATH-2	----	259	39	----	----	835
PleWF	----	----	----	----	----	----
EntA::L::MccV	----	----	347	149	34,948	34,133
EntA::L::HBD-3	----	----	----	----	51	755
EntA::L::dCATH-2	----	----	----	----	336	2,970
EntA::L::PleWF	----	----	86	85	2,656	2,772

<sup>a</sup> Antimicrobial activity against *P. damnosus* CECT4797 by using a microtiter plate assay (MPA), in bacteriocin units per milliliter (BU/mL). ---: No antimicrobial activity. Eluted fractions: SN: supernatant; AS: ammonium sulfate precipitation; GF: gel filtration; SE: Sepharose fast flow eluate; OE: Octyl Sepharose eluate; RP- FPLC: reversed-phase eluate.

**Figure 2.** MALDI-TOF MS analysis of purified supernatants from *P. pastoris* X-33EntA::L::MccV (A), *P. pastoris* X-33EntA::L::HBD-3 (B), *P. pastoris* X-33EntA::L::dCATH-2 (C) and *P. pastoris* X-33EntA::L::PleWF (D), eluted after RP-FPLC. Numbers indicate the molecular mass in daltons of most of the observed peptide fragments.







The pPICZαA protein expression vector, containing an strong and inducible promoter and the Kex2 signal cleavage site, has been used to drive the expression of synthetic genes encoding AMPs by *P. pastoris* X-33. Accordingly, the amino acid sequence following the Kex2 secretion signal may interfere with secretion of the fused peptides or proteins. Furthermore, the yields of recombinant proteins seem to be influenced by the Kex2 P1' site residue (Yang et al., 2013; Jiménez et al., 2013). In this study, the Kex2 P1' site residues for mature MccV, HBD-3, dCATH-2 and PleWF were the amino acids A, G, R and G, respectively, while the amino acid at the same Kex2 P1' site residue for the well expressed and biologically active

bacteriocin EntA, produced by recombinant *P. pastoris*, was T (Table 1). Thus, a much larger scientific effort would be devoted to characterize those N-terminal amino acids fused to the Kex2 signal cleavage with major influence in protein production by recombinant *P. pastoris*. A low antimicrobial activity was detected in eluted fractions by mature dCATH-2 produced by *P. pastoris*. The design of hybrid peptides derived from fusion of EntA to mature MccV, HBD-3, dCATH-2 and PleWF by means of a tri-G peptide also permitted determination of their antimicrobial activity in eluted fractions from purified supernatants of their recombinant *P. pastoris* producers (Table 4).

From the results obtained it may be suggested that very low yields of secreted and/or purified AMPs and hybrid peptides are obtained after cloning of synthetic genes encoding mature native and hybrid peptides, in *P. pastoris*. This confirms previous observations in which bacteriocins, cloned in different yeast platforms, have been produced with variable success regarding their production, secretion and functional expression (Borrero et al., 2012; Jiménez et al., 2013; Arbulu et al., 2015; Arbulu et al., unpublished results). It could also happen that incorrectly folded native and hybrid peptides are accumulated in the endoplasmic reticulum (ER) of recombinant *P. pastoris*, activating the unfolded protein response (UPR) and the ER-associated degradation (ERDA) of the misfolded bacteriocins, leading to persistent ER stress conditions causing much lower efficiencies to traffic through the host secretion machinery, apoptosis and cell death (Gasser et al., 2008; Stolz and Wolf, 2010; Love et al., 2012; Jiménez et al., 2013).

AMPs synthesized by eukaryotes have been produced, successfully, by *P. pastoris* (Chen et al., 2011; Peng et al., 2014; Zhang et al., 2015). However, the production of proteins and peptides by *P. pastoris* X-33 has been also reported to be highly variable, with cases of high/low secretory yields or even with no detected protein production (Burrowes et al., 2005; Love et al., 2012; Borrero et al., 2012; Yang et al., 2013). Many factors influencing the *P. pastoris* secretion efficiency are still unknown. The foreign peptide itself, low copy number integration of the expression vectors in the yeast DNA, mRNA stability, errors in mRNA translation, uncoordinated rates of protein synthesis, folding and translocation, and undesired proteolysis of heterologous proteins by resident proteases or by proteases in the extracellular space, cell-wall associated, or released into the culture medium as a result of cell disruption, may not only influence the secretion but also the functional expression of the produced protein or peptide (Ni et al., 2008; Love et al., 2012).

However, the results of this preliminary study suggest that the N-terminal region of EntA seems to drive the processing and secretion of hybrid peptides. However, further experiments are needed to best unravel the influence of the N-terminal region of EntA in the production, secretion and functional expression of the novel bacteriocin-AMPs-derived chimeras EntA::MccV, EntA::HBD-3, EntA::dCATH-2 and EntA::PleWF. Accordingly, the supernatants and eluted fractions from purified supernatants from *P. pastoris* producers of bacteriocin-AMPs-derived chimeras, must be evaluated for their antimicrobial activity and presence of the deduced chimeras by MALDI-TOF MS analysis. Furthermore, the use of MRM proteomics [MRM-ESI-LC/MS/MS (QTRAP)] may help to detect the presence of

purified AMPs, hybrid peptides and bacteriocin-AMPs-derived chimeras in supernatants of the recombinant *P. pastoris* producers (Arbulu et al., unpublished results).

The evaluation of novel procedures for purification and concentration of AMPs, hybrid peptides and bacteriocin-AMPs-derived chimeras from supernatants of the producer hosts, are also needed. Bioengineered AMPs with enhanced antimicrobial activity, antimicrobial spectra and overproduced by suitable heterologous hosts are a challenge and a need for evaluation of the AMPs as natural antimicrobial agents in food, animal husbandry and medicine. The development of novel cloning vectors, the easiest and more rapid purification of the AMPs from the producer cells, and the evaluation of different prokaryotic and eukaryotic expression platforms must be also explored.

### VIII.5 REFERENCES

- Arbulu, S., Jiménez, J.J., Gútiez, L., Cintas, L.M., Herranz, C., Hernández, P.E., 2015. Cloning and expression of synthetic genes encoding the broad antimicrobial spectrum bacteriocins SRCAM 602, OR-7, E-760, and L-1077, by recombinant *Pichia pastoris*. Biomed Res. Int. 2015
- Bahar, A.A., Ren, D., 2013. Antimicrobial peptides. Pharmaceuticals 6, 1543–1575.
- Borrero, J., Jiménez, J.J., Gútiez, L., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2011a. Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A in lactic acid bacteria. J. Biotechnol. 156, 76–86.
- Borrero, J., Brede, D.A., Skaugen, M., Diep, D.B., Herranz, C., Nes, I.F., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2011b. Characterization of garvicin ML, a novel circular bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). Appl. Environ. Microbiol. 77, 369–373.
- Borrero, J., Kunze, G., Jiménez, J.J., Böer, E., Gútiez, L., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2012. Cloning, production, and functional expression of the bacteriocin enterocin A, produced by *Enterococcus faecium* T136, by the yeasts *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, and *Arxula adeninivorans*. Appl. Environ. Microbiol. 78, 5956–5961.
- Bulet, P., Stöcklin, R., 2005. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. Protein Pept. Lett. 12, 3–11.
- Burrowes, O.J., Diamond, G., Lee, T.C., 2005. Recombinant expression of pleurocidin cDNA using the *Pichia pastoris* expression system. J. Biomed. Biotechnol. 2005, 374–384.
- Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernández, P.E., Holo, H., 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. Microbiol. 143, 2287–2294.
- Chen, Z., Wang, D., Cong, Y., Wang, J., Zhu, J., Yang, J., Hu, Z., Hu, X., Tan, Y., Hu, F., Rao, X., 2011. Recombinant antimicrobial peptide hPAB- $\beta$  expressed in *Pichia pastoris*, a potential agent active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 89, 281–291.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Håvarstein, L.S., Holo, H., Hernández, P.E., Nes, I.F., 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. J. Bacteriol. 182, 6806–6814.

- Cole, A.M., Weis, P., Diamond, G., 1997. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *J. Biol. Chem.* 272, 12008–12013.
- Conde, R., Arguello, M., Izquierdo, J., Noguez, R., Moreno, M., Lanz, H., 2012. Natural antimicrobial peptides from eukaryotic organisms, in: Bobbarala, V. (Ed.), *Antimicrobial Agents*. Intech Publisher Open Access.
- Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R.P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 777–788.
- Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J., Higgins, D.R., 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* 16, 23–52.
- De Smet, K., Contreras, R., 2005. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol. Lett.* 27, 1337–1347.
- Dhople, V., Krukemeyer, A., Ramamoorthy, A., 2006. The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 1499–1512.
- Drider, D., Rebuffat, S., 2011. Prokaryotic Antimicrobial Peptides. From Genes to Applications. Drider, D. and Rebuffat, S. (Eds). Springer Science+Business Media, New York.
- Duquesne, S., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., Rebuffat, S., 2007. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat. Prod. Rep.* 24, 708–734.
- Fath, M.J., Zhang, L.H., Rush, J., Kolter, R., 1994. Purification and characterization of colicin V from *Escherichia coli* culture supernatants. *Biochemistry* 33, 6911–6917.
- Gao, Z., Li, Z., Zhang, Y., Huang, H., Li, M., Zhou, L., Tang, Y., Yao, B. and Zhang, W., 2012. High-level expression of the *Penicillium notatum* glucose oxidase gene in *Pichia pastoris* using codon usage optimization. *Biotechnol. Lett.* 34, 507–514.
- Gasser, B., Saloheimo, M., Rinas, U., Dragosits, M., E. Rodríguez-Carmona, K. Baumann, M. Giuliani, E. Parrilli, P. Branduardi, C. Lang, D. Porro, P. Ferrer, M.L. Tutino, D. Mattanovich, Villaverde, A. 2008. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microb. Cell Fact.* 7:11.
- Håvarstein, L.S., Holo, H., Nes, I.F., 1994. The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Microbiology* 140, 2383–2389.
- Jiménez, J.J., Borrero, J., Diep, D.B., Gútiérrez, L., Nes, I.F., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2013. Cloning, production, and functional expression of the bacteriocin sakacin A (SakA) and two SakA-derived chimeras in lactic acid bacteria (LAB) and the yeasts *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40, 977–993.
- Jiménez, J.J., Borrero, J., Gútiérrez, L., Arbulu, S., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2014. Use of synthetic genes for cloning, production and functional expression of the bacteriocins enterocin A and bacteriocin E 50-52 by *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Biotechnol.* 56, 571–583. doi:10.1007/s12033-014-9731-7.
- Jiménez, J.J., Diep, D.B., Borrero, J., Gútiérrez, L., Arbulu, S., Nes, I.F., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2015. Cloning strategies for heterologous expression of the bacteriocin enterocin A by *Lactobacillus sakei* Lb790, *Lb. plantarum* NC8 and *Lb. casei* CECT475. *Microb. Cell Fact.* 14, 166.
- Kościuczuk, E.M., Lisowski, P., Jarczak, J., Strzałkowska, N., Jóźwik, A., Horbańczuk, J., Krzyżewski, J., Zwierzchowski, L., Bagnicka, E., 2012. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Mol Biol Rep* 39, 10957–10970.
- Love, K.R., Politano, T.J., Panagiotou, V., Jiang, B., Stadheim, T.A., Love, J.C., 2012. Systematic single-cell analysis of *Pichia pastoris* reveals secretory capacity limits

- productivity. PLoS ONE 7, e37915.
- Mao, R., Teng, D., Zhang, Y., Jiao, J., Cao, X., Wang, J. 2015. Optimization of expression conditions for a novel NZ2114-derived antimicrobial peptide-MP1102 under the control of the GAP promoter in *Pichia pastoris* X-33. BMC Microbiol., 15:57.
- Martín, M., Gutiérrez, J., Criado, R., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2007. Cloning, production, and expression of the bacteriocin enterocin A, produced by *Enterococcus faecium* PLBC21, in *Lactococcus lactis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76: 667-675.
- McCormick, J.K., Klaenhammer, T.R., Stiles, M.E., 1999. Colicin V can be produced by lactic acid bacteria. Letters in Appl. Microb. 29, 37–41.
- Molhoek, E.M., van Dijk, A., Veldhuizen, E.J.A., Dijk-Knijnenburg, H., Mars-Groenendijk, R.H., Boele, L.C.L., Kaman-van Zanten, W.E., Haagsman, H.P., Bikker, F.J., 2010. Chicken cathelicidin-2-derived peptides with enhanced immunomodulatory and antibacterial activities against biological warfare agents. Int. J. Antimicrob. Agents 36, 271–274.
- Mygind, P.H., Fischer, R.L., Schnorr, K.M., Hansen, M.T., Sönksen, C.P., Ludvigsen, S., Raventós, D., Buskov, S., Christensen, B., De Maria, L., Taboureau, O., Yaver, D., Elvig-Jørgensen, S.G., Sørensen, M.V., Christensen, B.E., Kjaerulff, S., Frimodt-Møller, N., Lehrer, R.I., Zasloff, M., Kristensen, H.-H., 2005. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. Nature 437, 975–980.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Ike, Y., 2014. Enterococcal bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to niche control, in: Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N. (Eds.), Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston.
- Ni, Z., Zhou, X., Sun, X., Wang, Y., Zhang, Y., 2008. Decrease of hirudin degradation by deleting the KEX1 gene in recombinant *Pichia pastoris*. Yeast 25, 1–8.
- O'Connor, P.M., Ross, R.P., Hill, C., Cotter, P.D. 2015. Antimicrobial antagonists against food pathogens: a bacteriocin perspective. Curr. Opin. Food Sci. 2, 51-57.
- Peng, Z., Wang, A., Feng, Q., Wang, Z., Ivanova, I.V., He, X., Zhang, B., Song, W. 2014. High-level expression, purification and characterisation of porcine  $\beta$ -defensin 2 in *Pichia pastoris* and its potential as a cost-efficient growth promoter in porcine feed. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98, 5487-5497.
- Reddy, K.V.R., Yedery, R.D., Aranha, C., 2004. Antimicrobial peptides: premises and promises. Int. J. Antimicrob. Agents 24, 536–547.
- Stolz, A., Wolf, D.H. 2010. Endoplasmic reticulum associated protein degradation: a chaperone assisted journey to hell. Biochim. Biophys. Acta 1803, 694–705.
- Tam, J.P., Wang, S., Wong, K.H., Tan, W.L., 2015. Antimicrobial peptides from plants. Pharmaceuticals 8, 711–757.
- Ward, N.J., Buckley, S.M., Waddington, S.N., Van den Driesche, T., Chuah, M.K., Nathwani, A.C., McIntosh, J., Tuddenham, E.G., Kinnon, C., Thraser, J. and McVey, J.H. 2011. Codon optimization of human factor VIII cDNAs leads to high level expression. Blood 117, 798-80.
- Weinacker, D., Rabert, C., Zepeda, A.B., Figueroa, C.A., Pessoa, A., Farías, J.G., 2014. Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. Braz. J. Microbiol. 44, 1043–1048.
- Yang, S., Kuang, Y., Li, H., Liu, Y., Hui, X., Li, P., Jiang, Z., Zhou, Y., Wang, Y., Xu, A., Li, S., Liu, P., Wu, D., 2013. Enhanced production of recombinant secretory proteins in *Pichia pastoris* by optimizing Kex2 P1' site. PLoS ONE 8, e75347.
- Yi, H.-Y., Chowdhury, M., Huang, Y.-D., Yu, X.-Q., 2014. Insect antimicrobial peptides and their applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98, 5807–5822.

- Zhang, Y., Teng, D., Wang, X., Mao, R., Cao, X., Hu, X., Zong, L., Wang, J., 2015. In vitro and in vivo characterization of a new recombinant antimicrobial peptide, MP1102, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99, 6255-6266.
- Zhao, Y., Jensen, O.N. 2009. Modification-specific proteomics: strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques. Proteomics 9, 4632–4641.



# CAPÍTULO *CHAPTER*

IX

**DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA GENÓMICA DE LA  
CEPA BACTERIOCINOGENICA DE *Enterococcus faecalis*  
DBH18, AISLADA DE ÁNADES REALES (*Anas platyrhynchos*)**

---

***DRAFT GENOME SEQUENCE OF THE  
BACTERIOCINOGENIC STRAIN *Enterococcus faecalis* DBH18,  
ISOLATED FROM MALLARD DUCKS (*Anas platyrhynchos*)***

**Aceptado para su publicación en Genome Announcements, ASM (2016)**





jga00416/jga4097dl6z | xppws | S=5 | 5/27/16 | 15:17 | Subject: Prokaryotes | DOI:10.1128/genomeA.00663-16 | NLM: brief-report

AMERICAN  
SOCIETY FOR  
MICROBIOLOGY

genomeA announcements

## Draft Genome Sequence of the Bacteriocinogenic Strain *Enterococcus faecalis* DBH18, Isolated from Mallard Ducks (*Anas platyrhynchos*)

Sara Arbulu,<sup>a</sup> Juan J. Jimenez,<sup>a\*</sup> Juan Borrero,<sup>a\*</sup> Jorge Sánchez,<sup>a\*</sup> Cyril Frantzen,<sup>b</sup> Carmen Herranz,<sup>a</sup> Ingolf F. Nes,<sup>b</sup> Luis M. Cintas,<sup>a</sup> Dzung B. Diep,<sup>b</sup> Pablo E. Hernández<sup>a</sup>

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain<sup>a</sup>; Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science, Norwegian University of Life Sciences, Ås, Norway<sup>b</sup>

\* Present address: Juan J. Jimenez, ACDPharma, Oslo, Norway; Juan Borrero, University College Cork, Cork, Ireland; Jorge Sánchez, Unidad Central de Identificación, CGPC, CNP, Madrid, Spain.

Here, we report the draft genome sequence of *Enterococcus faecalis* DBH18, a bacteriocinogenic lactic acid bacterium (LAB) isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). The assembly contains 2,836,724 bp, with a G+C content of 37.6%. The genome is predicted to contain 2,654 coding DNA sequences (CDSs) and 50 RNAs.

Received 19 May 2016 Accepted 23 May 2016 Published XXX

**Citation** Arbulu S, Jimenez JJ, Borrero J, Sánchez J, Frantzen C, Herranz C, Nes IF, Cintas LM, Diep DB, Hernández PE. 2016. Draft genome sequence of the bacteriocinogenic strain *Enterococcus faecalis* DBH18, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Genome Announc* 4(4):e00663-16. doi:10.1128/genomeA.00663-16.

**Copyright** © 2016 Arbulu et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Pablo E. Hernández, ehernan@vet.ucm.es.

The enterococci are a diverse group of gastrointestinal (GI) and ubiquitous lactic acid bacteria (LAB) with an important role in environmental, food, gut, and clinical microbiology and with additional applied, regulatory, and biotechnological interest (1, 2). However, enterococci are also in the spotlight as a major cause of nosocomial and, to a lesser extent, community-acquired infections, due to encoding natural and acquired antibiotic resistances and potential virulence determinants (3, 4). *Enterococcus faecalis* DBH18 is a bacteriocinogenic strain isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*), with elevated antimicrobial activity against Gram-positive bacteria, including *Listeria* spp. (5, 6), and containing the bacteriocin-producing genes *efl1097* (Enterocin V583) and the *entL50* (*entL50A-entL50B*)-like genes termed *entJS* (*entJSA-entJSB*) (EnterocinJSA-EnterocinJSB) (GenBank accession no. EF502034). In addition, *E. faecalis* DBH18 produces gelatinase (GelE), responsible for the production of bioactive peptides with high angiotensin converting enzyme-inhibitory activity (ACE-IA) and antihypertensive and antioxidant activities during its growth in bovine skim milk (BSM) (6, 7).

The genomic DNA from *E. faecalis* DBH18 was purified using the Genomic-tip 500/G kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and sequenced by using an Illumina MiSeq platform (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) at the Department of Chemistry, Biotechnology, and Food Science (Norwegian University of Life Sciences, Ås, Norway). A 300-bp paired-end library was constructed using a Nextera XT kit (Illumina, Inc.). Reads were quality filtered using Neson (version 0.130; P. Harrison, 2015) and *de novo* assembled using CLC Genomics Workbench 5.5 (CLC bio, Denmark). Contigs <1,000 bp and with coverage <5-fold were removed. Coding DNA sequences (CDSs) were predicted and annotated using the RAST (<http://rast.nmpdr.org/>) server (8). The draft genome of *E. faecalis* DBH18 consists of 32 contigs, for a total of 2,836,724 bp, with a G+C content of 37.6%. The total number of CDSs was 2,654, and the number of RNAs was 50. *In*

*silico* analysis of the draft genome sequence with the BAGEL3 software (<http://bagel2.molgenrug.nl/>) (9) confirmed the presence of the enterocin JS (EntJSA-EntJSB) biosynthetic gene (*entJSA-entJSB*) cluster, whereas genes encoding enterocin V583 (EntV583) and the metalloproteinases gelatinase (GelE) and serine protease (SprE) were found manually. No relevant antibiotic resistance genes were identified in this isolate, and the absence of the potential virulence genes *cylLMAB* (cytolysin precursor and processing genes), *ace* (adhesin to collagen), and *esp* (enterococcal surface protein) confirmed previous studies with this strain (5, 6). The presence of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR), considered a barrier to foreign DNA uptake, were not identified using CRISPRfinder (10). *E. faecalis* DBH18 has been deposited as *E. faecalis* CECT 8935 at the Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Valencia, Spain. Determination of the draft genome of *E. faecalis* DBH18 would facilitate studies on the synthesis of the leaderless bacteriocin EntJS (EntJSA-EntJSB) and strengthen its usefulness as a producer of bioactive peptides during growth in BSM and, possibly, other proteinaceous food substrates.

**Nucleotide sequence accession numbers.** This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession no. [LSFS000000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclseq/LSFS000000000). The version described in this paper is the first version, LSFS01000000.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (Spain) for the fellowship (FPI) awarded to S. Arbulu.

This work was supported by funding from project AGL2012-34829 from the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), by grant S2013/ABI-2747 from the Comunidad de Madrid (CAM), and by the EEA Grant NILS Science and Sustainability Coordinated Mobility of Researchers (017-ABEL-CM-2013) (Spain).

jga00416/jga4097d16z	xppws	S=5	5/27/16	15:17	Subject: Prokaryotes	DOI:10.1128/genomeA.00663-16	NLM: brief-report
----------------------	-------	-----	---------	-------	----------------------	------------------------------	-------------------

Arbulu et al.

## FUNDING INFORMATION

This work, including the efforts of Sara Arbulu, Juan J. Jiménez, Juan Borrero, Jorge Sánchez, Herranz Carmen, Luis M. Cintas, and Pablo E. Hernández, was funded by Comunidad de Madrid (S2013/ABI-2747). This work, including the efforts of Sara Arbulu, Cyril Frantzen, Herranz Carmen, Ingolf F. Nes, Luis M. Cintas, Dzung Bao Diep, and Pablo E. Hernández, was funded by EEA Grant NILS Science and Sustainability Coordinated Mobility of Researchers (017-ABEL-CM-2013). This work, including the efforts of Sara Arbulu, Juan J. Jiménez, Juan Borrero, Jorge Sánchez, Herranz Carmen, Luis M. Cintas, and Pablo E. Hernández, was funded by Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (AGL2012-34829).

## REFERENCES

1. Franz CM, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, Gálvez A. 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int J Food Microbiol* 151:125–140. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2011.08.014>.
2. Palmer KL, Godfrey P, Griggs A, Kos VN, Zucker J, Desjardins C, Cerqueira G, Gevers D, Walker S, Wortman J, Feldgarden M, Haas B, Birren B, Gilmore MS. 2012. Comparative genomics of enterococci: variation in *Enterococcus faecalis*, clade structure in *E. faecium*, and defining characteristics of *E. gallinarum* and *E. casseliflavus*. *MBio* 3:e00318-11. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00318-11>.
3. Gilmore MS, Lebreton F, van Schaik W. 2013. Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Curr Opin Microbiol* 16:10–16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2013.01.006>.
4. Van Tyne D, Gilmore MS. 2014. Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. *Annu Rev Microbiol* 68:337–356. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-micro-091213-113003>.
5. Sánchez J, Basanta A, Gómez-Sala B, Herranz C, Cintas LM, Hernández PE. 2007. Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int J Food Microbiol* 117:295–305. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2007.04.012>.
6. Gútiérrez L, Gómez-Sala B, Recio I, del Campo R, Cintas LM, Herranz C, Hernández PE. 2013. *Enterococcus faecalis* strains from food, environmental, and clinical origin produce ACE-inhibitory peptides and other bioactive peptides during growth in bovine skim milk. *Int J Food Microbiol* 166:93–101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2013.06.019>.
7. Gútiérrez L, Borrero J, Jiménez JJ, Gómez-Sala B, Recio I, Cintas LM, Herranz C, Hernández PE. 2014. Genetic and biochemical evidence that recombinant *Enterococcus* spp. strains expressing gelatinase (GelE) produce bovine milk-derived hydrolysates with high angiotensin converting enzyme-inhibitory activity (ACE-IA). *J Agric Food Chem* 62:5555–5564. <http://dx.doi.org/10.1021/jf5006269>.
8. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9:75. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.
9. Van Heel AJ, de Jong A, Montalbán-López M, Kok J, Kuipers OP. 2013. BAGEL3: automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-)bactericidal posttranslationally modified peptides. *Nucleic Acids Res* 41:W448–W453. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt391>.
10. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. 2007. CRISPRFinder: a Web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res* 35:W52–W57. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm360>.

# **CAPÍTULO** ***CHAPTER***

**X**

**EFFECTO DE HIDROLIZADOS LÁCTEOS FERMENTADOS  
Y DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS ANTIHIPERTENSIVOS EN  
LA MICROBIOTA FECAL HUMANA Y COMPOSICIÓN DE  
ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA**

---

***EFFECT OF BOVINE MILK-DERIVED FERMENTED  
HYDROLYSATES AND CHEMICALLY-SYNTHESIZED  
ANTIHYPERTENSIVE PEPTIDES ON HUMAN FECAL  
MICROBIOTA AND SHORT CHAIN FATTY ACIDS***



## X. 1. ABSTRACT

Bovine skim milk (BSM)-derived fermented hydrolysates produced by growth of *Enterococcus faecalis* DBH18 in BSM (BSMH), the membrane-filtered hydrolysates (BSMF) and the chemically synthesized antihypertensive peptides LHLPLP and HLPLP, were evaluated for their effect on the microbiota and short chain fatty acids (SCFAs) composition of human fecal samples. The phylogenetic composition of the fecal microbiota was assessed by 16S rRNA gene sequencing analysis. The main structure of the human fecal microbiota remained stable with Firmicutes, Bacteroidetes and Proteobacteria as the most prevalent phyla. However, at lower taxonomic levels some modifications could be observed. The family Enterococcaceae and the genera *Bifidobacterium* and *Blautia* increased but the genera *Oscillospira* decreased after addition of BSMH and BSMF, but not LHLPLP and HLPLP. The observed modifications in the microbiota were always greater by addition of BSMH than BSMF. The amounts of SCFAs were also observed to change after addition of the BSM-derived fermented hydrolysates and synthetic antihypertensive peptides. The amounts of propionate and butyrate were greater after addition of BSMH than addition of BSMF, LHLPLP and HLPLP. The production of propionate and butyrate by LHLPLP and HLPLP was close to that in control samples. The molar ratios for production of acetate:propionate:butyrate were slightly different for human fecal samples with added BSMH and BSMF than with added LHLPLP and HLPLP. Despite limitations in sample size, the impact of the addition of BSM-derived fermented hydrolysates on the composition of the human feces microbiota and the production of SCFAs, seems to be higher for the BSMH than for the BSMF hydrolysates. However, the addition of LHLPLP and HLPLP suggest that their effect was comparable to that observed in control samples. It would be recommended that food-derived fermented hydrolysates, containing beneficial bioactive peptides, would be evaluated for their effect on the microbiota and SCFAs production in human feces and, if possible, in experimental animals and the human gut microbiota.

**Keywords:** milk hydrolysates, antihypertensive peptides, microbiota, short chain fatty acids

## X.2. INTRODUCTION

The importance of the gut microbiota is a growing evidence in human health and disease (Marchesi et al., 2015). Keeping its balance is essential for the normal host metabolism, physiology, nutrition and immune function (Lozupone et al., 2012). Eubacteria predominate in the human gastro-intestinal tract (GI) tract but Archaea and Eukaryota also contribute to this complex environment. Two bacterial phyla dominate the human gut microbiota, Bacteroidetes and Firmicutes but Proteobacteria, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Fusobacteria and Cyanobacteria are also found (Eckburg et al., 2005). The role of gut microbiota in the human metabolism and the effect of orally administered compounds in human microbiota, especially antibiotics, has been investigated extensively (Haiser and Turnbaugh, 2013; Pérez-Cobas et al., 2013). However, less attention is being paid to compounds that targeting far from the gut may modify the gut microbiota and its byproducts, such as short chain fatty acids (SCFAs). SCFAs are glycolytic and phosphoketolase end-

products that may act as energy sources regulating sugar metabolism, lipogenesis, cell proliferation and differentiation, oxidative and metabolic stress, immunomodulatory and other metabolic functions (Pessione, 2012; Marchesi et al., 2012). Therefore, changes in the production of rates of major SCFAs by the human microbiota, are likely to have important biological consequences (Flint et al., 2012; Marchesi et al., 2016; Tanaka et al., 2016).

Food-derived bioactive peptides have recently gained attention as functional food components with health-promoting effects including antimicrobial, antioxidant, antithrombotic, antihypertensive, immunomodulatory, opioid and antiproliferative activities, among others (Hartmann and Meisel, 2007, Mills et al., 2011). These peptides are encrypted within the primary sequence of many dietary proteins but may be released by digestive enzymes, by fermentation or by hydrolysis with specific proteolytic enzymes and food grade proteolytic preparations sourced from animals, plants and microbes (Korhonen and Pihlanto, 2006; Gútiérrez et al., 2013). Among the bioactive peptides, those with angiotensin converting enzyme-inhibitory activity (ACE-IA) and blood pressure-lowering effects are of high interest due to their potential use in the treatment of elevated blood pressure and associated cardiovascular events (Phelan and Kerins, 2011; Martínez-Maqueda et al., 2012; Hernández-Ledesma et al., 2014).

Milk proteins are the main source of bioactive peptides, and ACE-inhibitory peptides (ACE-IP) have been isolated from milk fermented with thermophilic and mesophilic lactic acid bacteria (LAB), including enterococci (Muguerza et al., 2006; Quirós et al., 2007; Otte et al., 2011; Gútiérrez et al., 2013). Furthermore, peptides LHLPLP and HLPLP encrypted in bovine  $\beta$ -casein and liberated by fermentation with *E. faecalis* or by enzymatic hydrolysis of bovine caseins, are known to be potent *in vitro* ACE inhibitors (Quirós et al., 2008; Quirós et al., 2012), lowering the blood pressure of spontaneously hypertensive rats (SHR) after a single oral administration or long-term intake of fermented milk (Miguel et al., 2010; Sánchez et al., 2011). Simulated gastrointestinal digestion has shown that LHLPLP is resistant to digestive enzymes, but upon incubation using Caco-2 cells is partly hydrolysed by brush border peptidases, releasing the pentapeptide HLPLP (Quirós et al., 2009). Recent studies in rats have shown that after oral administration, HLPLP was biotransformed into smaller fragments and distributed throughout the body by the circulation blood (Sánchez-Rivera et al., 2014). Milk-derived hydrolysates produced during growth of *E. faecalis* DBH18 in bovine skim milk (BSM), showed a high ACE-IA and the presence of LHLPLP in the hydrolysates (Gútiérrez et al., 2013). Further studies demonstrated that production of hydrolysates and liberation of LHLPLP by *E. faecalis* DBH18 was due to the proteolytic activity of the extracellular enterococcal proteinase gelatinase (Gútiérrez et al., 2014).

Accordingly, BSM-derived fermented hydrolysates and both, the precursor LHLPLP and its pentapeptide derivative HLPLP, might be considered commercially attractive compounds and an alternative to other chemically active antihypertensive compounds for treatment of elevated blood pressure, due to the high prevalence of hypertension in the Western population. We report in this work preliminary findings in human feces microbiota shifts in composition and diversity and modifications in the concentration of SCFAs in human stool

samples, after addition of milk-derived fermented hydrolysates and the chemically synthesized antihypertensive peptides, LHLPLP and HLPLP.

### X.3. MATERIALS AND METHODS

#### X.3.1. Obtention of milk-derived hydrolysates and antihypertensive peptides

For obtention of milk-derived hydrolysates, 10 mL of reconstituted 10% (w/v) bovine skim milk-powder (BSM) (Oxoid, Cambridge, UK), heated at 121 °C for 5 min, was seeded with a loop of a frozen stock culture (-80 °C) of *Enterococcus faecalis* DBH18, isolated from Mallard ducks (Sánchez et al., 2007) and deposited as *E. faecalis* CECT8935 at the Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, (Spain) (Arbulu et al., in press). The cultures were grown at 37 °C for 24-48 h. A 3% (v/v) of the grown culture was then added to 100 mL of freshly made reconstituted 10% (w/v) BSM and the cultures were further grown at 37 °C for 24 h. The cultures were then centrifuged at 8,000 x g for 10 min and their supernatants filtered through 0.20 µm pore-size filters (Whatman Int. Ltd., Maidstone, UK). Fifty mL of the supernatants were lyophilized (BSMH) and another 50 mL were filtered through 3 kDa cut-off membrane filters (Amicon ultra-4, Millipore, MA, USA), to recover peptide fragments below 3 kDa (BSMF) and then, lyophilized. The lyophilized BSM-derived fermented hydrolysates (BSMH and BSMF) were stored at -20 °C, before use. The antihypertensive peptides LHLPLP and HLPLP were chemically synthesized by solid-phase peptide synthesis at GenScript USA Inc. (Piscataway Township, NJ, USA).

#### X.3.2. Preparation of human fecal samples for batch cultures

Three healthy adults with an omnivore diet, who had not received antibiotics in the previous 6 months and no history of gastrointestinal disorder, provided the fecal samples. Participants were given a container and instructions to collect stool. Samples were shortly stored at -20°C, before analysis. Two grams from each sample were diluted with PBS (0.01M phosphate-buffered saline) to 10% w/v. Diluted samples were then homogenized in a Stomacher® 400 Circulator (Seward, Worthing, UK) for 1 min and kept overnight at 37°C in an anaerobic chamber (95% N<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>) (Whitley A35 Workstation, Don Whitley Scientific Ltd., Shipley, West Yorkshire, UK). One g of the lyophilized BSMH and BSMF hydrolysates and 0.3 mg of the synthetic LHLPLP and HLPLP peptides, were added to 27 mL of a carbohydrate-free basal medium (CFBM) (Al-Tamimi et al., 2006), and kept in anaerobic conditions. Peptide amounts were calculated based on previous studies with casein-derived antihypertensive peptides (Sánchez-Rivera et al., 2014) and considering that the ACE-inhibitory activity (ACE-IA) for these hydrolysates and synthetic peptides, expressed as the protein concentration required to inhibit 50% of the ACE activity (IC<sub>50</sub>), were of 15.5 µg/mL for BSMH, 24.3 µg/mL for BSMF and 5.5 µg/mL for LHLPLP and HLPLP (Miguel et al., 2006; Gútiérrez et al., 2014). Doses of peptides were high enough to ensure a possible effect on the fecal microbiota. Finally, 3 mL of the diluted feces were added to the CFBM medium with the target peptides. Then, 4 mL aliquots were distributed into individual tubes and incubated at 37°C for 24 h, withdrawing tubes at 0, 6 and 24 h. Aliquots of 1 mL from the individual



tubes were centrifuged 10,000 x g for 10 min. The supernatants were discarded and the pellet resuspended in 400 µL of Stool Transport and Recovery Buffer (STAR buffer) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Tubes with feces but no hydrolysates or peptides were included as controls.

### **X.3.3. Purification of fecal genomic DNA**

Fecal genomic DNA was purified by using an automated protocol with a DNA extraction kit based on the use of paramagnetic particles (LGC Genomics, Teddington, Middlesex, UK). Briefly, the samples were subjected to mechanical lysis using glass beads and the genomic DNA was purified by elution of the samples from the paramagnetic particles by a downstream process, as described by the manufacturer (developed by Genetic Analysis; <http://www.genet-analysis.com>). The purified genomic DNA was stored at -20 °C, before further analysis. The DNA concentrations in samples were measured by using a Qubit™ 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and a NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

### **X.3.4. Microbial community analysis by Illumina sequencing**

The purified genomic DNA was randomly fragmented, tagged, amplified and prepared for 16S rRNA sequencing by using an Illumina MiSeq platform (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) at the Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science (Norwegian University of Life Sciences, Ås, Norway).

Initially, DNA samples (3 fecal samples x 5 treatments x 3 time-points) were PCR amplified in duplicate (90 samples in total) using the tagged-universal PRK primers, PRK341F (5'-CCTACGGGRBGCASCAG-3') and PRK806R (5'-GGACTACYVGGGTATCTAAT-3'), based on amplification of conserved regions targeting the V3-V4 region of bacterial 16S rRNA, resulting in amplicons of 466 bp (Yu et al., 2005). Each PCR reaction (25 µL) contained 1 µL of extracted DNA (unknown concentration), 1,25 U HOT FIREpol® DNA polymerase (Solis Biodyne, Tartu, Estonia), 1 x HOT FIREpol® buffer B2, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTP mix and 0,2 µM of each primer. PCR conditions were: 95°C for 15 min, 25 cycles of 95°C for 30 sec, 50°C for 30 sec and 72°C for 45 sec and a final extension at 72°C for 7 min. PCR products were checked on a 1% agarose gel and AMPure® purified (Beckman Coulter, Oslo, Norway) on a Biomek 3000 (Beckman Coulter) laboratory automation robot.

Index PCR construction of the Illumina library pools was carried out with modified PRK primers containing indexes and adapters for Illumina sequencing (Figure 1). Purified DNA products from the previous PCR assay were used. Each sample was given a unique pair of primers as an identification tag. A total of 96 combinations existed in the library (16 forward and 6 reverse primers). As described above, each PCR reaction (25 µL) contained 1 µL of the purified DNA, 1,25U FIREpol® DNA polymerase, 1x HOT FIREpol® buffer B2, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTP mix and 0,2µM of each primer. PCR conditions were: 95°C for 5 min, 10 cycles of 95°C for 30 sec, 55°C for 1 min and 72°C for 45 sec, and a final extension at

72°C for 7 min. The amplicon size was 594 bp. PCR products were checked on a 1% agarose gel and pooled to equal DNA concentration by mixing 10, 5 or 2.5 µL according to nucleotide fragment concentrations. The pooled samples were cleaned-up with a Mag-Bind® RxnPure Plus kit (Biotek, Winooski, VT, USA)

**Figure 1. Illumina-indexed PRK primers used in this study**

---

**PRKi Forward primers**

- 1 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatctagtcaaCCTACGGGRBGCASCAG
- 2 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatctagtccCCTACGGGRBGCASCAG
- 3 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatctatgtcaCCTACGGGRBGCASCAG
- 4 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatctccgtccCCTACGGGRBGCASCAG
- 5 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatctgtagagCCTACGGGRBGCASCAG
- 6 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatctgtccgcCCTACGGGRBGCASCAG
- 7 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatctgtgaaaCCTACGGGRBGCASCAG
- 8 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatctgtggccCCTACGGGRBGCASCAG
- 9 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatctgtttcgCCTACGGGRBGCASCAG
- 10 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatctcgtacgCCTACGGGRBGCASCAG
- 11 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatctgagtggCCTACGGGRBGCASCAG
- 12 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatctggtagcCCTACGGGRBGCASCAG
- 13 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatctactgatCCTACGGGRBGCASCAG
- 14 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatctatgagcCCTACGGGRBGCASCAG
- 15 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatctattcctCCTACGGGRBGCASCAG
- 16 aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctcttccgatctcaaaagCCTACGGGRBGCASCAG

**PRKi Reverse primers**

- 5 caagcagaagacggcatacagatCACTCTgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGGACTACYVGGGTATCTAAT
  - 6 caagcagaagacggcatacagatATTGGCgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGGACTACYVGGGTATCTAAT
  - 7 caagcagaagacggcatacagatGATCTGgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGGACTACYVGGGTATCTAAT
  - 8 caagcagaagacggcatacagatTCAAGTgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGGACTACYVGGGTATCTAAT
  - 9 caagcagaagacggcatacagatCTGATCgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGGACTACYVGGGTATCTAAT
  - 10 caagcagaagacggcatacagatAAGCTAgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGGACTACYVGGGTATCTAAT
- 

### X.3.5. Data analysis

Data retrieved from Illumina sequencing of the 16S rRNA gene was analysed using the Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) pipeline (Caporaso et al., 2010). The raw sequences were quality filtered, paired end reads joined, combined with metadata and demultiplexed based on barcode information. Operational taxonomic units (OTUs) were clustered based on 99% homology and taxonomy was assigned according to Greengenes database (DeSantis et al., 2006). Diversity analysis was calculated from the samples based on OTUs and metadata. The significance of the changes over time, treatment and fecal sample were also evaluated through QIIME.

### X.3.6. Determination of short chain fatty acids (SCFAs)

The determination of short chain fatty acids (SCFA) in human stool samples was determined by gas chromatography (GC). After the sample's mechanical lysis as described before, 300  $\mu$ L of supernatants were filtered using a modified nylon 0.2  $\mu$ m membrane centrifugal filter (VWR, Radnor, PA, USA), and centrifuged at 8,000  $\times$  g for 5 min. One hundred  $\mu$ L of the filtrates were transferred to a GC sampling vial (Thermo Scientific Chromacol™, UK) in a 1:1 ratio of sample and 5% formic acid, and capped. Standard fatty acids solutions were run for identification and quantification of fatty acids in samples. Solutions 0.25 mM, 1.25 mM and 0.625 mM containing acetic acid, propionic acid, butyric acid, i-butyric acid, valeric acid and i-valeric acid, were prepared fresh for each run.

Separation of SCFAs was performed using an Autosystem GC (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) with a flame ionization detector (FID) equipped with a Stabilwax®-DA (30m  $\times$  0.5mm  $\times$  0.25 $\mu$ m) capillary column (Restek, Bellefonte, PA, USA). Helium (Aga, Oslo, Norway) was used as the carrier gas at constant pressure set to 20 psig (138 kPa). The temperature program was 90 °C for 2 min, then ramp 10 °C/min to 155 °C followed by ramp 45 °C/min to 250 °C, with 1 min hold time. The injected sample volume was 0.5  $\mu$ L with a split ratio of 20:1, and helium at a constant flow rate of 20 mL/min. Detection was performed using the TotalChrom workstation software, version 6.2.1 (Perkin Elmer).

## X.4. RESULTS

### X.4.1. 16S rRNA gene analysis and composition of the fecal microbiota

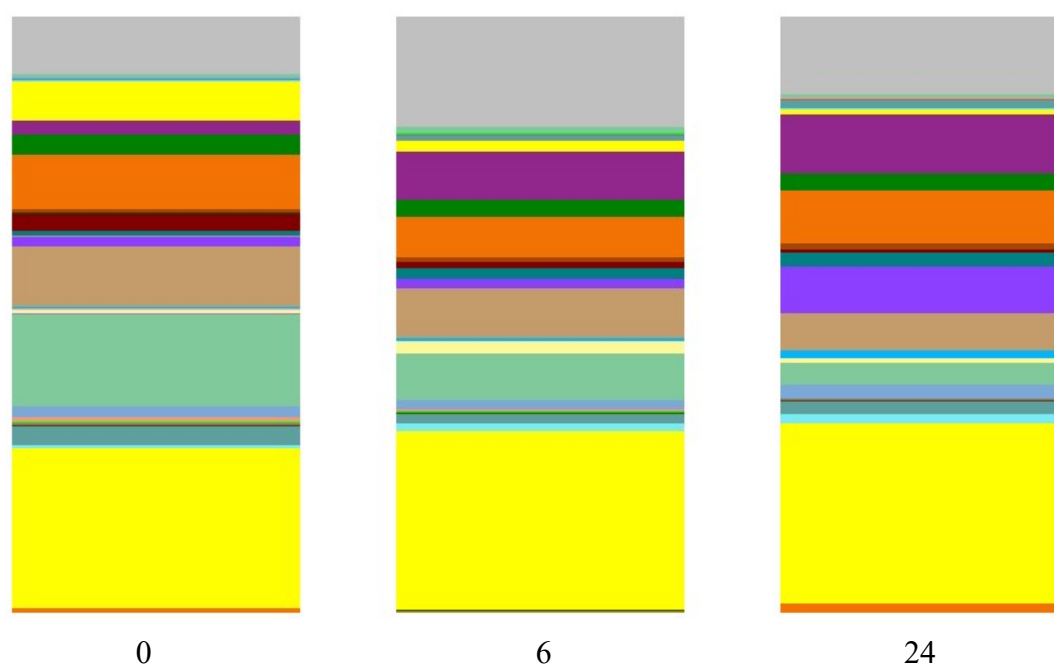
The phylogenetic composition of the fecal microbiota in human samples was assessed by 16S rRNA gene sequencing. Human fecal samples were amplified with 16S rRNA gene-targeting primers and further amplified with an Illumina-adapted primer set. Sequencing data were available for 96 purified genomic DNA samples, including controls. Sequences were processed using the QIIME pipeline. To evaluate microbial diversity, QIIME categorizes and groups similar sequences that share a threshold level of sequence identity into a defined OTU, allowing the assignment of taxonomic lineages. A total of 213 bacterial OTUs were generated, belonging to 7 phyla.

The dominant phyla in the human fecal samples were Firmicutes, Bacteroidetes and Proteobacteria with mean values of 51.6%, 33.0%, 14.4%, respectively, regardless of the treatment or sample. Bacteroidaceae was the most prevalent family among Bacteroidetes (mean value 29.0%), while families Ruminococcaceae and Lachnospiraceae were the most common in Firmicutes with mean values of 21.3% and 16.5%, respectively. Enterobacteriaceae was the most frequent family among Proteobacteria (mean value 13.7%). We found similar structure in microbial composition among the three fecal samples. Further comparison of the 16S rDNA reads at the genera level at 0, 6 and 24 h, revealed that genera *Parabacteroides* increased from 0.5% to 1.4%, genera *Blautia* from 1.5% to 7.8%, and genera

*Oscillospira* from 2.3% to 10.1%, while other genera, such as *Lachnospira* or *Ruminococcus* decreased (Figure 2A).

Changes were observed when the BSM-derived fermented hydrolysates, BSMH and BSMF, and the synthetic antihypertensive peptides, LHLPLP and HLPLP, were added to human fecal samples during 24 h (Figure 2B). The genera *Blautia* was more frequent after adding the BSM-derived fermented hydrolysates than with the synthetic peptides or control samples (BSMH, 8.5%; BSMF, 6.6%; LHLPLP-, HLPLP- and control  $\leq 1\%$ ). The presence of the family Enterococaceae and the genera *Bifidobacterium* was also higher in samples treated with BSMH and BSMF than with the synthetic peptides or control samples. On the other hand, the genera *Oscillospira* was less frequent on samples treated with BSMH and BSMF (3.4% and 4.2%, respectively) than with the synthetic peptides ( $\approx 10\%$ ). Overall, human fecal samples, treated with either LHLPLP or HLPLP, displayed similar microbial composition as the control samples.

**Figure 2.** Changes in human fecal microbial communities during time (A) and after addition of bovine skim milk (BSM)-derived fermented hydrolysates and synthetic antihypertensive peptides (B). Relative abundance of sequences classified to the level of bacterial genera. See legend, with the most abundant genera.



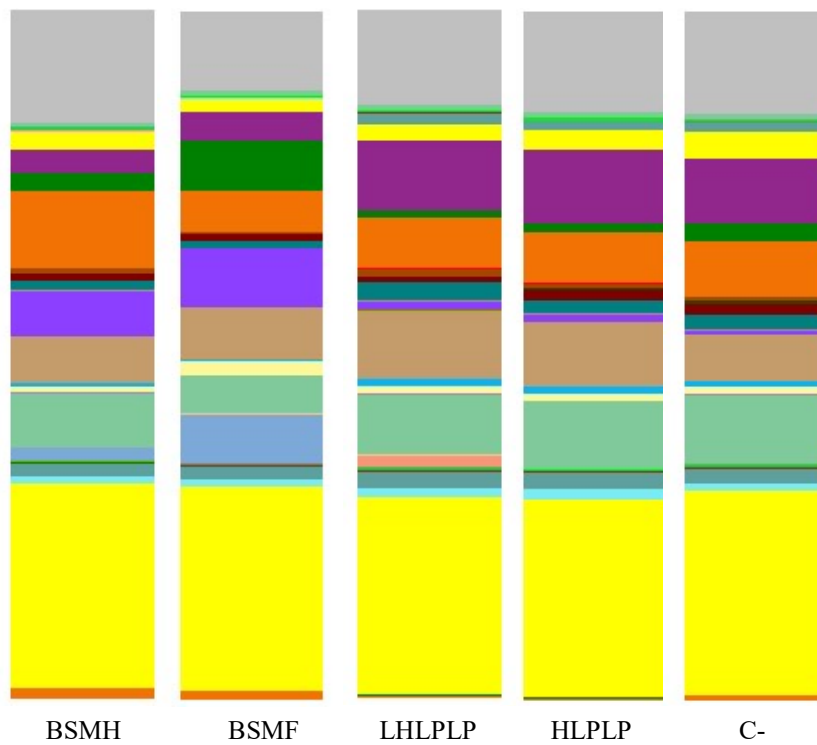
**Figure 2A**

# X. EFFECT OF ANTIHYPERTENSIVE PEPTIDES ON HUMAN FECAL MICROBIOTA AND SCFAs

Legend	Taxonomy <sup>a</sup>	Total		Time (hours)		
		Count	%	0	6	24
				%	%	%
	k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Bifidobacteriales;f_Bifidobacteriaceae;g_Bifidobacterium	0	0.9%	0.7%	0.3%	1.5%
	k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Coriobacteriia;o_Coriobacteriales;f_Coriobacteriaceae;g_	0	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_Bacteroidaceae;g_Bacteroides	1	29.0%	26.7%	30.1%	30.3%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_Porphyromonadaceae;g_Parabacteroides	0	1.1%	0.5%	1.2%	1.4%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_Rikenellaceae;g_	0	2.2%	3.0%	1.6%	2.1%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_[Barnesiellaceae];g_	0	0.2%	0.4%	0.2%	0.2%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_[Odoribacteraceae];g_Butyricimonas	0	0.2%	0.3%	0.2%	0.2%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_[Odoribacteraceae];g_Odoribacter	0	0.1%	0.2%	0.1%	0.1%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Bacillales;f_Bacillaceae;Other	0	0.4%	0.7%	0.4%	0.0%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f_Enterococcaceae;Other	0	1.9%	1.8%	1.4%	2.4%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_g_	0	9.0%	15.5%	7.9%	3.6%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Christensenellaceae;g_	0	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Clostridiaceae;g_	0	1.1%	0.6%	1.9%	0.7%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Clostridiaceae;g_Clostridium	0	0.1%	0.2%	0.1%	0.0%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;Other	0	0.6%	0.3%	0.3%	1.1%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_	0	8.2%	10.1%	8.3%	6.3%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Blautia	0	3.6%	1.5%	1.5%	7.8%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Coprococcus	0	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Dorea	0	1.7%	1.0%	1.6%	2.3%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Lachnospira	0	1.4%	2.7%	1.1%	0.3%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Roseburia	0	0.1%	0.3%	0.1%	0.0%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_[Ruminococcus]	0	0.7%	0.4%	0.7%	1.0%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Ruminococcaceae;g_	0	8.2%	9.1%	6.8%	8.8%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Ruminococcaceae;g_Faecalibacterium	0	3.1%	3.5%	2.9%	2.9%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Ruminococcaceae;g_Oscillospira	0	6.9%	2.3%	8.2%	10.1%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Ruminococcaceae;g_Ruminococcus	0	3.1%	6.6%	1.8%	0.8%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Veillonellaceae;g_Dialister	0	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Veillonellaceae;g_Phascolarctobacterium	0	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_[Mogibacteriaceae];g_	0	0.8%	0.2%	0.8%	1.4%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_[Tissierellaceae];g_Peptoniphilus	0	0.1%	0.0%	0.1%	0.2%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Erysipelotrichi;o_Erysipelotrichales;f_Erysipelotrichaceae;g_	0	0.2%	0.2%	0.3%	0.1%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Erysipelotrichi;o_Erysipelotrichales;f_Erysipelotrichaceae;g_[Eubacterium]	0	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria;p_Lentisphaerae;c_[Lentisphaeria];o_Victivallales;f_Victivallaceae;g_	0	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria;p-Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_RF32;f_g_	0	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria;p-Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Alcaligenaceae;g_Sutterella	0	0.7%	0.5%	0.9%	0.6%
	k_Bacteria;p-Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Enterobacteriales;f_Enterobacteriaceae;g_	0	13.7%	9.5%	18.6%	12.9%

<sup>a</sup>k, kingdom; p, phylum; c, class; o, order; f, family; g, genera.

Figure 2B



Legend	Taxonomy <sup>a</sup>	Total		Hydrolysate/Peptide <sup>b</sup>				
		Count	%	BSMH	BSMF	LHLPLP	HLPLP	C-
				%	%	%	%	%
	k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Bifidobacteriales;f_Bifidobacteriaceae;g_Bifidobacterium	1.3%	0	1.6%	0.8%	0.3%	0.6%	0.3%
	k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Coriobacteriia;o_Coriobacteriales;f_Coriobacteriaceae;g_	0.0%	0	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_Bacteroidaceae;g_Bacteroides	29.6%	2	29.7%	29.0%	28.8%	29.6%	28.7%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_Porphyromonadaceae;g_Parabacteroides	1.1%	0	0.9%	1.1%	1.2%	1.1%	1.4%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_Rikenellaceae;g_	1.9%	0	1.8%	2.1%	2.5%	2.2%	2.4%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_[Barnesiellaceae];g_	0.3%	0	0.2%	0.2%	0.2%	0.3%	0.2%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_[Odoribacteraceae];g_Butyricimonas	0.2%	0	0.2%	0.2%	0.3%	0.3%	0.2%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_[Odoribacteraceae];g_Odoribacter	0.1%	0	0.1%	0.1%	0.1%	0.2%	0.2%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Bacillales;f_Bacillaceae;Other	0.0%	0	0.0%	0.3%	1.8%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f_Enterococcaceae;Other	7.1%	0	1.8%	1.5%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_g_	5.7%	1	8.0%	8.7%	8.8%	10.0%	9.7%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Christensenellaceae;g_	0.0%	0	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Clostridiaceae;g_	1.8%	0	0.9%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Clostridiaceae;g_Clostridium	0.1%	0	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_EtOH8;g_	0.0%	0	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;Other	0.3%	0	0.3%	0.5%	1.0%	0.6%	0.8%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_	7.6%	0	6.8%	7.4%	10.0%	6.9%	9.4%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Blautia	8.5%	0	6.6%	3.0%	1.1%	0.5%	1.0%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Coprococcus	0.1%	0	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.3%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Dorea	1.0%	0	1.3%	1.7%	2.6%	2.1%	1.8%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Lachnospira	1.0%	0	1.0%	1.3%	0.8%	1.7%	1.7%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Roseburia	0.0%	0	0.1%	0.1%	0.1%	0.3%	0.1%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_[Ruminococcus]	0.3%	0	0.8%	0.6%	1.1%	0.7%	0.7%
	k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Ruminococcaceae;g_	5.9%	1	11.0%	9.0%	7.5%	8.0%	7.5%

k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Ruminococcaceae;g_Faecalibacterium	7.2%	0	2.7%	3.2%	0.9%	2.7%	1.3%
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Ruminococcaceae;g_Oscillospira	4.2%	0	3.4%	7.5%	10.3%	9.3%	10.5%
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Ruminococcaceae;g_Ruminococcus	1.9%	0	2.6%	2.9%	2.3%	3.8%	2.9%
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Veillonellaceae;g_Dialister	0.1%	0	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_[Mogibacteriaceae];g_	0.1%	0	0.3%	0.8%	1.6%	1.2%	1.2%
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_[Tissierellaceae];g_Peptoniphilus	0.0%	0	0.0%	0.1%	0.1%	0.2%	0.1%
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Erysipelotrichi;o_Erysipelotrichales;f_Erysipelotrichaceae;g_	0.1%	0	0.2%	0.2%	0.1%	0.3%	0.3%
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Erysipelotrichi;o_Erysipelotrichales;f_Erysipelotrichaceae;g_[Eubacterium]	0.0%	0	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%
k_Bacteria;p_Lentisphaerae;c_[Lentisphaeria];o_Victivallales;f_Victivallaceae;g_	0.0%	0	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_RF32;f_g_	0.0%	0	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Alcaligenaceae;g_Sutterella	0.9%	0	0.5%	0.8%	0.7%	0.7%	0.6%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Enterobacteriales;f_Enterobacteriaceae;g_	11.4%	1	16.4%	14.9%	13.7%	14.9%	14.6%

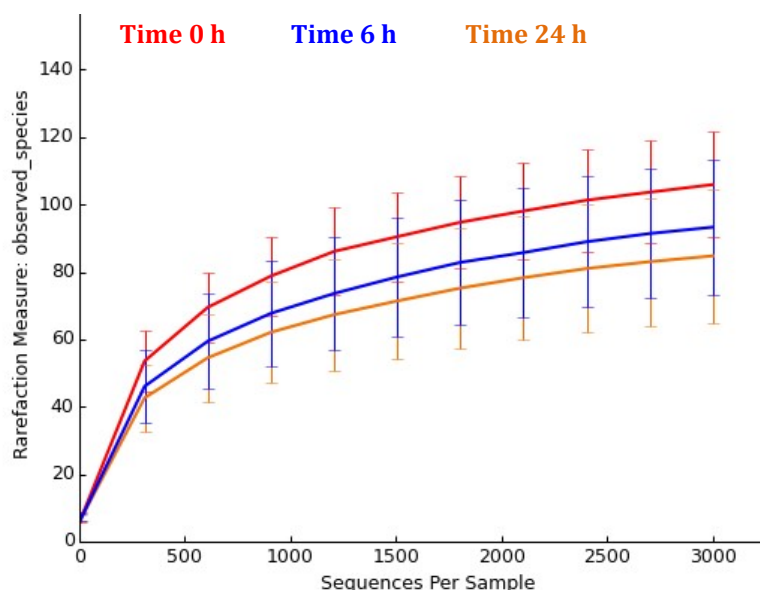
<sup>a</sup>k, kingdom; p, phylum; c, class; o, order; f, family; g, genera.

<sup>b</sup>BSMH, bovine skim milk-fermented hydrolysate; BSMF, bovine skim milk-fermented hydrolysate filtrate; LHLPLP and HLPLP, synthetic antihypertensive peptides.

### X.4.2. Diversity of the microbiota

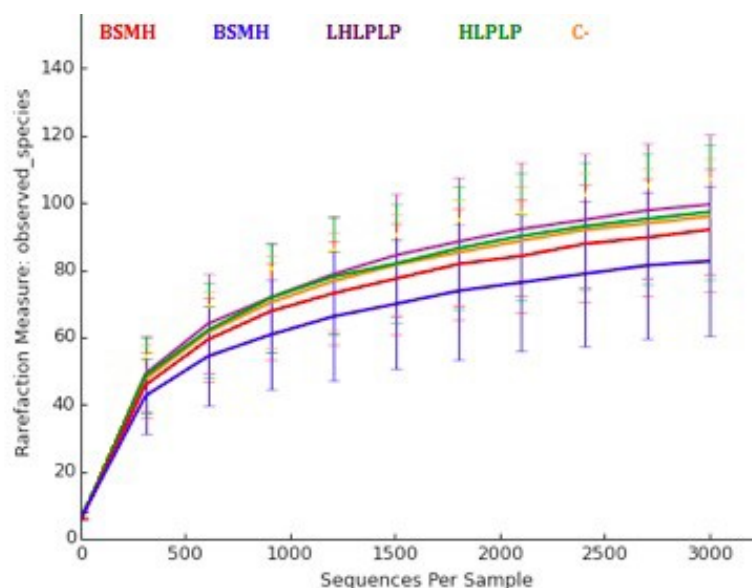
Diversity of the microbiota in human fecal samples was explored by alpha-diversity calculations through QIIME. These data were used to construct the rarefaction plots shown in Figure 3. The number of observed species was plotted against number of sequences. Species richness decreased over time (Figure 3A), and this decrease was lower with the BSM-derived hydrolysates than with the synthetic peptides, the latter with a behaviour close to that of control samples (Figure 3B). The beta diversity data was collected from the QIIME weighted unfrac analysis using Bray-Curtis dissimilarity index and analysed using the Emperor package, yielding a principal component analysis plot for the time-points and treatments evaluated. Gut communities overlapped by time-points or treatment but showed clustering of each fecal sample (Figure 4).

**Figure 3.** Rarefaction curves showing observed species with respect to sequences per sample between the three time points (A) and treatment of the human samples (B).



**Figure 3B**

Figure 3B



#### X.4.3. Short chain fatty acids (SCFAs) composition

The short fatty fatty acid (SCFAs) composition of human fecal samples, treated with BSM-derived fermented hydrolysates and synthetic antihypertensive peptides, was determined by gas chromatography (GC). The levels of SCFAs changed over time after addition of milk-derived fermented hydrolysates and synthetic peptides (Table 1). The highest concentrations were measured for acetic acid, followed by butyric acid, valeric acid and propionic acid. Acetic acid was the only SCFA detected at time 0, but amounts of most individual fatty acids increased along time. Isobutyric acid was not found in measurable amounts in any of the samples. The largest amounts of SCFAs were reached after treatment of samples with BSMH for 24 h, with amounts of 562.8-, 45.7-, 127.3-, 10.0- and 103.7 mM/kg wet feces for acetic acid, propionic acid, butyric acid, isovaleric and valeric acid, respectively.

The amount of SCFAs showed, after addition of BSMH, a 1.6- to 3.6-fold increase in their concentrations, as compared to control samples (Table 1). When BSMF was added, only the amount of acetic acid increased 2.8-fold over the control samples whereas the amount of the other SCFAs remained less (1.1- to 2.1-fold lower) than that of the control samples. The amounts of acetate, propionate and butyrate in human feces with added LHLPLP and HLPLP, were close to those in the control samples. However, it would be noticed that concentrations of isovaleric acid in human feces with added LHLPLP and HLPLP were 2.4- to 2.5 higher than in control samples, and that amounts of valeric acid were less for LHLPLP (1.4-fold lower) and HLPLP (2.6-fold lower), as compared to control samples (Table 1).

The molar ratios for acetate: propionate: butyrate changed over time within each sample, with a reduction in the percentage of acetate in favour of increasing amounts of propionate and butyrate (Table 1). At time 0 h, only acetate was detected in the evaluated samples with the ratio acetate: propionate: butyrate being 100:00:00, but the amounts of propionate and butyrate increased thereafter. Human fecal samples with added BSMH and BSMF showed



ratios for acetate: propionate: butyrate of 76:06:17 and 88:04:08 after 24 h, respectively. An increase in the amounts of propionate and butyrate were also observed after addition of LHLPLP (68:09:24) and HLPLP (69:08:22), being these amounts close to those in control samples (66:10:24).

## X.5. DISCUSSION

Of high scientific and applied interest is the evaluation of the effect on the human microbiota of food-derived hydrolysates, enriched in bioactive peptides with beneficial effects upon human health once released by digestive enzymes, fermentation or by hydrolysis with specific proteolytic enzymes and food grade proteolytic preparations. Of interest is also to determine the effect on the human microbiota of chemically synthesized biologically-active peptides. The human gut microbiota is usually characterized through the analysis of the fecal microbiota, which does not truly reflect the full diversity of the gastrointestinal tract, but it is the best option until new technologies make the sampling easier.

In this study, the results obtained suggest that the main structure of the human fecal microbiota, after addition of the BSM-derived fermented hydrolysates and synthetic antihypertensive peptides, remained stable regarding phyla, supporting the idea of a stable community within individuals (Lozupone et al., 2012; Donaldson et al., 2016). Firmicutes, Bacteroidetes and Proteobacteria were the most prevalent phyla, according to previous studies on human gut microbiota (Ley et al., 2006; Sekirov et al., 2010). However, at lower taxonomic levels some modifications could be observed at the level of family and genera. The Enterococcaceae family and the genera *Bifidobacterium* increased when BSMH and BSMF were added to human samples. An increase in genera *Blautia* was also observed when the milk-derived fermented hydrolysates were added to human feces while a decrease in the genera *Oscillospira* was observed after addition of the BSMH and BSMF hydrolysates, but not with the synthetic antihypertensive peptides LHLPLP and HLPLP (Figure 2B). The increase or decrease in the cited bacterial family and genera was always greater by addition of the BSMH- than by the BSMF-hydrolysate.

In this context, is known that *E. faecalis* DBH18 shows antimicrobial activity during growth in complex media (Sánchez et al., 2007) but also in BSM (Gútiérrez et al., 2013), possibly due to production of the bacteriocins enterocin V583 (EntV583) and enterocin JS (EntJSA-EntJSB) (Arbulu et al., in press). This suggests that bacteriocins themselves, other non-identified yet bioactive peptides with antimicrobial activity encrypted in bovine caseins and/or non-digestible oligosaccharides, present in the BSMH and BSMF fermented hydrolysates, could be partially responsible of the observed effects in the microbiota of human feces. Production of bacteriocins by lactic acid bacteria (LAB) and their antimicrobial effect has been

**Table 1. Concentration and molar percentage of SCFAs in human fecal samples after treatment with milk-derived fermented hydrolysates and synthetic antihypertensive peptides**

Hydrolysate/ Peptide <sup>a</sup>	Time	Fatty acids mM/kg of feces						Molar Percentage (Acetate:Propionate:Butyrate)
		Acetic acid	Propionic acid	Isobutyric acid	Butyric acid	Isovaleric acid	Valeric acid	
BSMH	0	45.6	0.0	0.0	0.0	0.0	18.5	100:00:00
BSMH	6	179.2	9.0	0.0	38.7	4.1	45.8	79:04:17
BSMH	24	562.8	45.7	0.0	127.3	10.0	103.7	76:06:17
BSMF	0	54.9	0.0	0.0	0.0	0.0	32.3	100:00:00
BSMF	6	385.8	37.5	0.0	56.5	9.0	50.7	80:08:12
BSMF	24	520.0	23.9	0.0	49.2	2.4	25.7	88:04:08
LHLPLP	0	5.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100:00:00
LHLPLP	6	175.8	18.8	0.0	32.3	5.3	10.4	78:08:14
LHLPLP	24	180.0	22.7	0.0	63.1	12.2	20.7	68:09:24
HLPLP	0	5.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100:00:00
HLPLP	6	88.1	0.0	0.0	29.6	0.0	0.0	75:00:25
HLPLP	24	225.7	27.2	0.0	73.0	12.9	11.2	69:08:22
C-	0	4.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100:00:00
C-	6	46.7	0.0	0.0	10.7	0.0	23.8	81:00:19
C-	24	185.2	28.1	0.0	68.5	5.1	28.7	66:10:24

<sup>a</sup> Hydrolysate/Peptide: BSMH, bovine skim milk-fermented hydrolysate; BSMF, bovine skim milk-fermented hydrolysate filtrated; LHLPLP and HLPLP, synthetic peptides; C-, control samples without BSM-derived hydrolysates and synthetic peptides

considered a probiotic trait (Dobson et al., 2012). However, few studies have assessed the probiotic effect of bacteriocin production by LAB on the gut microbiota in live animals (Riboulet-Bisson et al., 2012; Kwok et al., 2015; Yang et al., 2015).

The observed increase in the genera *Bifidobacterium*, after addition of the BSM-derived fermented hydrolysates, may also reflect a modulation in the growth of certain bacterial groups, due to the antimicrobial activity of bifidobacteria (Figure 2B). Given that bifidobacteria are also believed to be involved in prevention of diarrhea, establishment of a healthy microbiota, lactose intolerance and inflammatory and immune defense responses, its presence may be beneficial for the host health (Lee and O'Sullivan, 2010; Turrone et al., 2011). *Blautia* is a genus in the bacterial family Lachnospiraceae and members of this family are important for nutrient assimilation. This family is one of the major taxonomic groups of the human microbiota degrading complex polysaccharides to SCFAs including acetate, propionate and butyrate, that can be used for energy by the host. Since *Blautia* specific-host oligotypes reflects host specificity, they can serve as universal markers to assess fecal contamination in environmental samples (Eren et al., 2015). A lower presence of the genera *Oscillospira* was observed in samples with added BSMH and mostly BSMF, but not LHLPLP and HLPLP (Figure 2B). As observed in studies with monozygotic twin pairs and increase in body mass index (BMI), is possible that presence of *Oscillospira* in human fecal samples is associated to a shift in a less proportion of primary fiber degraders (Tims et al., 2013).

Overall, subtle modifications in the structure of the human fecal microbiota were more evident after addition of the BSM-derived hydrolysates, BSMH and BSMF, than after addition of the synthetic antihypertensive peptides LHLPLP and HLPLP. And the modifications induced by BSMH, usually larger than those by BSMF. Furthermore, modifications of the human fecal microbiota after addition of LHLPLP and HLPLP were close to that in control samples (Figure 2B). The diversity of microbiota decreased over time (Figure 3) and no OTU grouping was observed concerning time or treatment of samples (Figure 4). Nevertheless, the evaluation of a large number of human feces and deep sequencing analysis would elucidate further modifications in the human fecal microbiota at lower taxonomic levels, associated to food-derived fermented hydrolysates and/or specific bioactive peptides.

In this study, the amounts of SCFAs have been observed to change during time and after addition of BSM-derived hydrolysates and antihypertensive peptides. Acetate was the only SCFA detected at time 0, and a moderate rise of propionate and butyrate was measured after 6 and 24 h of addition of the BSM-derived fermented hydrolysates and synthetic peptides to human feces (Table 1). Propionate and butyrate amounts in human feces were higher by addition of BSMH, than BSMF. Moreover, the rise in the amounts of propionate and butyrate after 6 h addition of BSMF to human feces, resulted in their reduction after 24 h. The production of propionate and butyrate by the antihypertensive peptides LHLPLP and HLPLP, was close to that in control samples (Table 1). Ratios for acetate:propionate:butyrate were slightly different in human fecal samples with added BSMH and BSMF than with added LHLPLP and HLPLP (Table 1).

Carbohydrate fermentation is a core activity of the human gut microbiota (Marchesi et al., 2016). Under anaerobic conditions undigested carbohydrates are fermented mainly to SCFAs, as terminal electron acceptors and energy sources for the host. Other reported influences include immunomodulatory functions, resolution of inflammation, changes in food motility, satiety and food intake, prevention of growth of pathogens, and anticancer effects (Flint et al., 2012). The Bacteroidetes phylum mainly produces acetate and propionate, whereas the Firmicutes phylum produces butyrate as its primary metabolic end product. Some SCFAs can also affect the host in a defined manner, such as acetate regulating cholesterol synthesis and adipose tissue deposition, propionate decreasing cholesterol concentration in blood and inhibiting fatty acid synthesis and butyric acid reducing the risk of colon cancer, cell growth and differentiation (Robles-Alonso and Guarner, 2012; den Besten et al., 2013). Modifications in the amount of SCFAs have been shown as a result in modulation of the gut microbiota (Tanaka et al., 2016). Accordingly, modifications in the amounts of SCFAs induced, mostly by addition of BSMH and BSMF, reflect modifications in the structure and composition of the microbiota of human feces with the added BSM-derived fermented hydrolysates.

This may be the first preliminary study to evaluate the effect on human fecal microbiota of a milk-derived fermented hydrolysate with high ACE-IA and antihypertensive activity by a bacteriocinogenic and highly proteolytic *E. faecalis* strain. Despite limitations in sample size, the impact of the addition of BSM-derived fermented hydrolysates to the composition of the human feces microbiota and the production of SCFAs, seems to be higher for the BSMH than for the BSMF hydrolysates, possibly due to larger amounts of protein-derived nutrients, non-digestible oligosaccharides and antimicrobial active peptides in the former hydrolysate than in the latter. However, the addition of the synthetic peptides LHLPLP and HLPLP suggest that their effect was comparable to that observed in control samples. It would be recommended that food-derived fermented hydrolysates, containing beneficial bioactive peptides, would be evaluated for their effect on the microbiota and SCFAs production in human feces and, if possible, in experimental animals and human gut microbiota.

## X.6. REFERENCES

- Al-Tamimi, M. a. H.M., Palframan, R.J., Cooper, J.M., Gibson, G.R., Rastall, R.A., 2006. In vitro fermentation of sugar beet arabinan and arabino-oligosaccharides by the human gut microflora. *J. Appl. Microbiol.* 100, 407–414.
- Arbulu, S., J.J. Jiménez, J. Borrero, J. Sánchez, C. Frantzen, I.F. Nes, C. Herranz, L.M. Cintas, D.B. Diep, P.E. Hernández, 2016. Draft genome sequence of the bacteriocinogenic strain *Enterococcus faecalis* DBH18, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *GenomeA*, (in press).
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T.,

- Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336.
- den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., Bakker, B.M., 2013. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.* 54, 2325–2340.
- DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., Andersen, G.L., 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5069–5072.
- Dobson, A., Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C., 2015. Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1–6.
- Donaldson, G.P., Lee, S.M., Mazmanian, S.K., 2016. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat. Res. Microbiol.* 14, 20–32.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A., 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635–1638.
- Eren, A.M., Sogin, M.L., Morrison, H.G., Vineis, J.H., Fisher, J.C., Newton, R.J. McLellan, S.L., 2015. A single genus in the gut microbiome reflects host preference and specificity. *ISME J.* 9, 90–10.
- Flint, H.J., Scott, K.P., Louis, P., Duncan, S.H., 2012. The role of gut microbiota in nutrition and health. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 577–589.
- Gutiérrez, L., Gómez-Sala, B., Recio, I., del Campo, R., Cintas, L.M., Herranz, C., Hernández, P.E., 2013. *Enterococcus faecalis* strains from food, environmental, and clinical origin produce ACE-inhibitory peptides and other bioactive peptides during growth in bovine skim milk. *Int. J. Food Microbiol.* 166, 93–101.
- Gutiérrez, L., Borrero, J., Jiménez, J.J., Gómez-Sala, B., Recio, I., Cintas, L.M., Herranz, C., Hernández, P.E., 2014. Genetic and biochemical evidence that recombinant *Enterococcus* spp. strains expressing gelatinase (GelE) produce bovine milk-derived hydrolysates with high angiotensin converting enzyme-inhibitory activity (ACE-IA). *J. Agric. Food Chem.* 62, 5555–5564.
- Haiser, H.J., Turnbaugh, P.J., 2013. Developing a metagenomic view of xenobiotic metabolism. *Pharmacol. Res.* 69, 21–31.
- Hartmann, R., Meisel, H., 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 163–169.
- Hernández-Ledesma, B., García-Nebot, M.J., Fernández-Tomé, S., Amigo, L., Recio, I., 2014. Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. *Int. Dairy J.*, 38, 82–100.
- Korhonen, H., Pihlanto, A., 2006. Bioactive peptides: production and functionality. *Int. Dairy J.*, 16, 945–960.
- Kwok, L.Y., Guo, Z., Zhang, J., Wang, L., Qiao, J., Hou, Q., Zheng, Y., Zhang, H., 2015. The impact of oral consumption of *Lactobacillus plantarum* P-8 on faecal bacteria revealed by pyrosequencing. *Benef. Microbes* 6, 405–413.
- Lee, J.-H., O'Sullivan, D.J., 2010. Genomic insights into Bifidobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 378–416.

- Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., Gordon, J.I., 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022–1023.
- Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., Knight, R., 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489, 220–230.
- Marchesi, J.R., Adams, D.H., Fava, F., Hermes, G.D.A., Hirschfield, G.M., Hold, G., Quraishi, M.N., Kinross, J., Smidt, H., Tuohy, K.M., Thomas, L.V., Zoetendal, E.G., Hart, A., 2016. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut* 65, 330–339.
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I., Hernández-Ledesma, B., 2012. Antihypertensive peptides from food proteins: a review. *Food Funct.* 3, 350–361.
- Miguel, M., Recio, I., Ramos, M., Delgado, M.A., Aleixandre, M.A., 2006. Antihypertensive effect of peptides obtained from *Enterococcus faecalis*-fermented milk in rats. *J. Dairy Sci.* 89, 3352–3359.
- Miguel, M., Gómez-Ruiz, J.A., Recio, I., Aleixandre, A., 2010. Changes in arterial blood pressure after single oral administration of milk-casein-derived peptides in spontaneously hypertensive rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 1422–1427.
- Mills, S., Ross, R.P., Hill, C., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., 2011. Milk intelligence: mining milk for bioactive substances associated with human health. *Int. Dairy J.* 21, 377–401.
- Muguerza, B., Ramos, M., Sánchez, E., Manso, M.A., Miguel, M., Aleixandre, A., Delgado, M.A., Recio, I., 2006. Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *Int. Dairy J.* 16, 61–69.
- Otte, J., Lenhard, T., Flambard, B., Sørensen, K.I., 2011. Influence of fermentation temperature and autolysis on ACE-inhibitory activity and peptide profiles of milk fermented by selected strains of *Lactobacillus helveticus* and *Lactococcus lactis*. *Int. Dairy J.* 21, 229–238.
- Pérez-Cobas, A.E., Gosalbes, M.J., Friedrichs, A., Knecht, H., Artacho, A., Eismann, K., Otto, W., Rojo, D., Bargiela, R., Bergen, M. von, Neulinger, S.C., Däumer, C., Heinsen, F.-A., Latorre, A., Barbas, C., Seifert, J., Santos, V.M. dos, Ott, S.J., Ferrer, M., Moya, A., 2013. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. *Gut* 62, 1591–1601.
- Pessione, E., 2012. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 1–15.
- Phelan, M., Kerins, D., 2011. The potential role of milk-derived peptides in cardiovascular disease. *Food Funct.* 2, 153–167.
- Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M.A., Miguel, M., Aleixandre, A., Recio, I., 2007. Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *Int. Dairy J.* 17, 33–41.
- Quirós, A., Dávalos, A., Lasunción, M.A., Ramos, M., Recio, I., 2008. Bioavailability of the antihypertensive peptide LHLPLP: Transepithelial flux of HLPLP. *Int. Dairy J.* 18, 279–286.
- Quirós, A., Contreras, M.M., Ramos, M., Amigo, L., Recio, I., 2009. Stability of gastrointestinal enzymes and structure-activity relationship of beta-casein peptides with antihypertensive properties. *Peptides*, 30, 1848–1853.

- Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Martín-Álvarez, P.J., Recio, I., 2012. Production of antihypertensive peptide HLPLP by enzymatic hydrolysis: optimization by response surface methodology. *J. Dairy Sci.*, 95, 4280-4285.
- Riboulet-Bisson, E., Sturme, M.H.J., Jeffery, I.B., O'Donnell, M.M., Neville, B.A., Forde, B.M., Claesson MJ, Harris H, Gardiner GE, Casey PG, Lawlor PG, O'Toole PW, Ross R.P., 2012. Effect of *Lactobacillus salivarius* bacteriocin ABP118 on the mouse and pig intestinal microbiota. *PLoS One* 7:e31113.
- Robles-Alonso, V., Guarner, F 2012. Linking the gut microbiota to human health. *Br. J. Nutr.* 109, S21-S26.
- Sánchez, D., Kassan, M., Contreras, M.M., Carrón, R., Recio, I., Montero, M.J., Sevilla, M.A. 2011. Long-term intake of a milk casein hydrolysate attenuates the development of hypertension and involves cardiovascular benefits. *Pharmacol. Res.* 63, 395-404.
- Sánchez, J., Basanta, A., Gómez-Sala, B., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2007. Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int. J. Food Microbiol.* 117, 295–305.
- Sánchez-Rivera, L., Ares, I., Miralles, B., Gómez-Ruiz, J.Á., Recio, I., Martínez-Larrañaga, M.R., Anadón, A., Martínez, M.A., 2014. Bioavailability and kinetics of the antihypertensive casein-derived peptide HLPLP in rats. *J. Agric. Food Chem.* 62, 11869–11875.
- Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C.M., Finlay, B.B., 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* 90, 859–904.
- Tanaka, S., Yamamoto, K., Yamada, K., Furuya, K., Uyeno, Y., 2016. Relationship of enhanced butyrate production by colonic butyrate-producing bacteria to immunomodulatory effects in normal mice fed an insoluble fraction of *Brassica rapa* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 2693-2699.
- Tims, S., Derom, C., Jonkers, D.M., Vlietinck, R., Saris, W.H., Kleerebezem, M., de Vos, W.M., Zoetendal, E.G. 2013. Microbiota conservation and BMI signatures in adult monozygotic twins. *ISME J.* 7, 7017-717.
- Turroni, F., van Sinderen, D., Ventura, M. 2011. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *Int. J. Food Microbiol.*, 149, 37-44.
- Yang, Y., Zhao, X., Le, M.H. A., Zijlstra, R.T., Gänzle, M.G., 2015. Reutericyclin producing *Lactobacillus reuteri* modulates development of fecal microbiota in weanling pigs. *Front. Microbiol.* 6:762.
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J., Hwang, S., 2005. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol. Bioeng.* 89, 670–679.

# **CAPÍTULO**

**XI**

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL**

---





**Nota aclaratoria:** a lo largo de este capítulo se muestran los resultados descritos en los capítulos 3-10 y las conclusiones derivadas de éstos. Para ello, se hará referencia a figuras y tablas de los capítulos citados, las cuales se reseñarán con el número del capítulo de dónde proceden, seguido de su número de identificación en el capítulo correspondiente.

## **XI.1. ACTIVIDAD BACTERIOCINOGENICA, SEGURIDAD Y POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTERIAS LÁCTICAS (BAL) AISLADAS DE HECES DE BUITRES LEONADOS (*Gyps fulvus* subsp. *fulvus*)**

### **Resumen**

Las bacterias lácticas (BAL) forman parte de la microbiota intestinal y, muchas de ellas, producen péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal o bacteriocinas, con un elevado interés como conservadores naturales de los alimentos y como agentes antimicrobianos. Las BAL bacteriocinogénicas también se consideran vectores atractivos para el transporte, distribución y liberación de proteínas y péptidos terapéuticos y como probióticos. En este contexto, los buitres leonados (*Gyps fulvus* subespecie *fulvus*) que se alimentan casi exclusivamente de carroña sin sufrir, aparentemente, signos de enfermedad podrían considerarse como reservorios de BAL bacteriocinogénicas con potenciales aplicaciones biotecnológicas. Por ello, en este trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana, presencia de genes que sintetizan bacteriocinas, factores potenciales de virulencia, susceptibilidad a antibióticos y las relaciones filogenéticas de BAL aisladas de heces de buitres leonados (*Gyps fulvus* subsp. *fulvus*). En este estudio, el 36% de las BAL aisladas mostraron actividad antimicrobiana siendo los enterococos el grupo mayoritario de BAL con actividad antimicrobiana (91%) y *E. faecium* (40%) la especie más antagonista de entre los enterococos. La mayoría de enterococos activos (75%) codificaba diversas bacteriocinas, siendo la enterocina A (EntA) la bacteriocina más frecuentemente identificada. La mayoría de enterococos (88%) mostró resistencias a muchos antibióticos. La utilización de técnicas de ERIC-PCR y MLST permitió determinar el genotipado y seguridad de los enterococos evaluados. La purificación de los sobrenadantes, mediante un procedimiento multicromatográfico, de las BAL con mayor actividad antimicrobiana permitió la purificación a homogeneidad de las bacteriocinas producidas. La determinación de la masa molecular de las bacteriocinas producidas mediante MALDI-TOF MS, la determinación de su secuencia aminoacídica N-terminal por degradación de Edman y la secuenciación *de novo* por MALDI TOF/TOF MS de las bacteriocinas purificadas, permitió la identificación y caracterización de las bacteriocinas producidas en los sobrenadantes de los cultivos productores. El aislado *E. faecium* M3K31 se identificó como productor de enterocina HF (EntHF), una bacteriocina con una elevada actividad antimicrobiana frente a *Listeria* spp. y de gran interés como posible conservante natural de los alimentos. Además, debido a la ausencia o poca presencia de factores potenciales de virulencia *E. faecium* M3K31 también podría considerarse como un probiótico seguro para su empleo en nutrición animal.

### **XI.1.1. Identificación de bacterias lácticas (BAL) con actividad antimicrobiana**

En este trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de 924 BAL aisladas de heces de buitre leonado frente a 3 microorganismos Gram-positivos (*Pediococcus damnosus* CECT4797, *Lactococcus lactis* BB24 y *Listeria innocua* CECT910) y 4 Gram-negativos (*Yersinia ruckeri* LMG3279, *Aeromonas salmonicida* LMG3776, *Campylobacter jejuni* ATCC33560 y *Campylobacter jejuni* NCTC11168). Un 36% de los aislados (332 cepas) mostraron actividad antimicrobiana directa frente a, al menos, uno de los microorganismos indicadores Gram-positivos empleados. Sin embargo, ninguno de los aislados mostró actividad antimicrobiana frente a ninguno de los microorganismos Gram-negativos evaluados incluyendo cepas de *C. jejuni*. Diversos estudios han demostrado que los buitres no constituyen un reservorio especial de *Campylobacter* spp. (Marín et al., 2014; Vela et al., 2015), por lo que podría pensarse que bacterias distintas a las BAL podrían estar inhibiendo o controlando su desarrollo. Estudios recientes también han descrito bacteriocinas producidas de BAL capaces de inhibir a *Campylobacter* (Lohans et al., 2014), aunque ninguna de ellas ha sido completamente caracterizada o producidas por hospedadores microbianos heterólogos (Lohans et al., 2014; Arbulu et al., 2015). También se ha descrito que algunos lipopéptidos no ribosomales producidos por *Bacillus* y *Paenibacillus* spp. manifiestan una elevada actividad antimicrobiana frente a *C. jejuni* (Lohans et al., 2014). Por ello, grupos microbianos distintos de las BAL deberían evaluarse con mayor profundidad por su actividad antimicrobiana frente a *Campylobacter* spp. no solamente en heces de buitres leonados sino, también, en otros reservorios animales y alimentarios.

De las BAL con actividad antimicrobiana, 95 aislados se identificaron taxonómicamente mediante secuenciación de los genes *16S rDNA* y *sodA*, siendo los enterococos el grupo identificado mayoritario con 30 *E. faecalis*, 38 *E. faecium*, 1 *E. hirae* y 1 *E. mundtii*, además de 5 *Lactobacillus brevis* y 1 *Lb. plantarum*. El resto de aislados se identificaron como *Enterococcus* spp. Los enterococos constituyen, por tanto, el género mayoritario de BAL con actividad antimicrobiana identificados en las heces de buitres leonados. Otros estudios también han descrito enterococos productores de bacteriocinas en BAL aisladas de mamíferos, aves y peces (Sánchez et al., 2007, Muñoz-Atienza et al., 2013, Gómez-Sala et al., 2015 y Araújo et al., 2015), pero no con una prevalencia tan alta como la descrita en este estudio (91%). Los enterococos también se han identificado como el género microbiano más aislado de muestras faríngeas y cloacales de buitres leonados euroasiáticos (Vela et al., 2015), buitres negros americanos (Roggenbuck et al., 2014) y en la glándula uropígea de las abubillas (Rodríguez-Ruano et al., 2015).

La actividad antimicrobiana de una selección de 28 BAL con actividad bacteriocinogénica (9 *E. faecalis*, 16 *E. faecium*, 1 *E. hirae*, 1 *E. mundtii*, y 1 *Lb. brevis*) se evaluó mediante un test de difusión en agar frente a 12 bacterias Gram-positivas y 3 Gram-negativas. Los aislados con mayor actividad antimicrobiana fueron los de *E. faecium*, *E. faecalis*, *Lb. brevis* y *E. mundtii* M3M33. Sin embargo, *E. hirae* M4S3 no mostró actividad antimicrobiana en sus sobrenadantes libres de células (Tabla III.2 y Tabla III.3). De gran interés es destacar la elevada actividad antimicrobiana de *E. faecium* M3K31, muy activo frente a la mayoría de los indicadores Gram-positivos evaluados, incluyendo *L. lactis* BB24 (Tabla III.3), una BAL

reconocida por su poca o nula sensibilidad a bacteriocinas de la clase IIa (Ramnath et al., 2004; Martín et al., 2006; Kjos et al., 2011). Cuando las BAL con mayor actividad antimicrobiana se evaluaron frente a 11 *Listeria* spp. mediante un ensayo en placas microtituladoras, una vez más, los sobrenadantes libres de células de *E. faecium* M3K31 destacaron por su elevada actividad antimicrobiana frente a las listerias evaluadas (Tabla III.4).

### **XI.1.2. Identificación de genes estructurales responsables de la síntesis de bacteriocinas**

El ADN genómico purificado de 28 BAL (10 *E. faecalis*, 15 *E. faecium*, 1 *E. hirae*, 1 *E. mundtii* y 1 *Lb. brevis*) con actividad antimicrobiana directa o en sus sobrenadantes libres de células, se analizaron mediante amplificación génica por técnicas de PCR para determinar la presencia de genes estructurales que codifican la síntesis de 21 bacteriocinas. Todos los aislados, excepto *E. hirae* M4S3 mostraron la presencia de genes estructurales que codificaban, al menos, la síntesis de una bacteriocina (Tabla III.5). La producción de bacteriocinas es un rasgo deseable para la consideración de los aislados productores como posibles probióticos, mientras la presencia de genes que codifican varias bacteriocinas parece ser un rasgo común entre los enterococos bacteriocinogénicos. De los resultados de este trabajo se desprende que todos los *E. faecalis* poseían el gen *entV583*, *E. faecalis* M2M6 poseía 5 genes estructurales para la síntesis de bacteriocinas y *E. faecalis* M1S20 codificaba tres. Entre los aislados de *E. faecium*, el gen *entA* se detectó en el 86,6% de los aislados, con *E. faecium* M1M10 codificando la síntesis de 5 bacteriocinas distintas. Sin embargo, *E. faecium* M3K31, el aislado con una mayor actividad antimicrobiana, sólo codificaba el gen *entP* de entre los 21 genes evaluados, lo que hace muy difícil establecer una correlación entre la presencia de genes estructurales que codifican la síntesis de bacteriocinas y su actividad antimicrobiana. No obstante, se conoce que la producción de bacteriocinas puede verse afectada por modificaciones ambientales como la temperatura (Criado et al., 2006), así como por modificaciones en los genes estructurales o en los promotores que regulan su transcripción, inmunidad, transporte o secreción (Martín et al., 2007 y Sánchez et al., 2007).

### **XI.1.3. Determinación de la presencia de factores potenciales de virulencia, sensibilidad a antibióticos y actividad hemolítica**

Los enterococos se reconocen como microorganismos con efectos beneficiosos en alimentos fermentados, como cultivos iniciadores y como probióticos (Franz et al., 2011), pero también se asocian a infecciones nosocomiales y, en menor medida, a infecciones en personas no hospitalizadas (Willems et al., 2012). *E. faecalis* codifica más factores potenciales de virulencia que *E. faecium* (Eaton et al., 2001 y Sánchez et al., 2007), por lo que en este trabajo evaluamos aquéllos *E. faecalis* con actividad antimicrobiana elevada por la presencia de genes que codifican factores potenciales de virulencia (Tabla III.6). Tres de los *E. faecalis* evaluados codificaban los genes *cylL<sub>L</sub>*-*cylL<sub>LS</sub>* pero sólo *E. faecalis* PM2-13 codificaba los genes *cylL<sub>MAB</sub>* y, en consecuencia, solamente este aislado mostró actividad hemolítica. La mayoría de los *E. faecalis* codificaban el gen *ace* y los genes responsables de síntesis de las metaloendopeptidasas gelatinasa E (GelE) y serina proteinasa (SprE). Ninguno de los aislados de *E. faecalis* evaluados codificó la proteína de superficie de enterococos (Esp), lo que es

positivo, ya que Esp promueve la adhesión a superficies y la evasión del sistema inmune.

Los enterococos son generalmente resistentes a macrólidos, cefalosporinas y tetraciclinas y algunos muestran resistencia a altas concentraciones de gentamicina (Hollenbeck et al., 2012). Un 96% de los enterococos bacteriocinogénicos analizados fue resistente frente a, al menos, uno de los antibióticos evaluados y un 88% de los aislados resultó resistente a 2-9 antibióticos. Sin embargo, todos los enterococos evaluados fueron sensibles a la teicoplanina. Las resistencias antimicrobianas observadas en los enterococos evaluados podrían atribuirse a que los buitres se alimentan de restos de animales medicados (McEwen y Fedorka-Cray, 2002; Margalida et al., 2012). No obstante, a pesar de lo descrito algunos enterococos como *E. faecalis* M3M42 y *E. faecium* M3K31 sólo mostraron resistencia a la rifampicina.

#### **XI.1.4. Evaluación de la seguridad de *E. faecium* M3K31**

De los resultados obtenidos se desprende que *E. faecium* M3K31 manifestó ausencia de los marcadores de virulencia *esp*, *hyl<sub>Efm</sub>* y *IS16* y sensibilidad a la ampicilina, cumpliendo los requerimientos de la EFSA (EFSA, 2012) para su utilización como un probiótico seguro en nutrición animal.

#### **XI.1.5. Genotipado molecular de los enterococos con actividad antimicrobiana mediante ERIC-PCR y MLST**

En este trabajo los análisis mediante ERIC-PCR de las cepas de *E. faecalis* aisladas de buitres leonados y otras de origen alimentario, ambiental y clínico revelaron la existencia de 2 grupos bacterianos diferentes con un 50% de similitud y sin una relación filogenética entre ambos (Figura III.1A). Los aislados de *E. faecium* analizados también se dividieron en dos grupos. En este caso, 13 de los 14 aislados de buitres formaron uno de los grupos (60% de similitud) con una relación filogenética entre ellos, mientras el otro grupo contenía enterococos aislados de distintos orígenes (Figura III.1B).

Las técnicas de análisis mediante MLST han permitido la agrupación por su similitud de los enterococos de origen hospitalario y relacionadas con infecciones nosocomiales tanto en *E. faecalis* (Ruiz-Garbajosa et al., 2006; Galloway-Peña et al., 2011), como en *E. faecium* (Willems et al., 2012). Por ello, los *E. faecalis* de origen hospitalario se asocian en los complejos clonales CC2 y CC9, representados por las secuencias alélicas tipo ST6 y ST9, respectivamente. Igualmente, los análisis mediante MLST realizados en este trabajo permitieron la anotación de *E. faecalis* M3M42 como ST167 y de *E. faecalis* M1S19 como ST76 y, por ello, no incluidos en los complejos clonales hospitalarios previamente citados (Figura III.S1). En este contexto, *E. faecalis* M3M42 con los genes *gelE-sprE*, sensible a la mayoría de los antibióticos evaluados y sin factores potenciales de virulencia podría postularse como una cepa potencialmente útil productora de péptidos bioactivos durante su desarrollo en leche desnatada de vaca (Gútiez et al., 2013, 2014).

Por otra parte, los *E. faecium* asociados a infecciones nosocomiales se han asociado al complejo clonal CC17 que incluye las secuencias alélicas tipo ST17, ST18, ST78 y ST192.

De los resultados de este trabajo se desprende que *E. faecium* M1M10 con la secuencia alélica tipo ST22, y *E. faecium* PM1-27 como ST670 se consideran próximas al complejo clonal CC17, mientras que *E. faecium* M3K31 con la secuencia alélica tipo ST76 se muestra muy alejada del complejo clonal CC17 por lo que se considera como un enterococo potencialmente más seguro (Figura III.S1).

#### **XI.1.6. Purificación de bacteriocinas producidas por enterococos, espectrometría de masas y secuenciación aminoacídica**

La purificación de la actividad antimicrobiana del sobrenadante de *E. faecium* M1M10 que codifica genes estructurales para la síntesis de diversas bacteriocinas, permitió un incremento de 1.397 veces su actividad antimicrobiana específica y una recuperación del 32% de su actividad antimicrobiana inicial. El análisis por MALDI-TOF MS de la fracción purificada mostró un fragmento peptídico mayoritario de 5.519,8 Da, lo que sugiere que la bacteriocina resultó purificada a homogeneidad (Figura III.2A). La determinación, por degradación de Edman de la secuencia aminoacídica N-terminal del péptido purificado reveló la secuencia aminoacídica parcial ENDHRMPNELNRPNN que, inequívocamente, se corresponde con la de la enterocina B (EntB). La masa molecular teórica de la EntB es de 5.465,2 Da, por lo que la diferencia de 54 Da observada con respecto a la masa molecular teórica podría deberse a modificaciones en su secuencia aminoacídica o a modificaciones posttraduccionales todavía desconocidas. Más aún, la ausencia de otros fragmentos peptídicos en la actividad antimicrobiana purificada de *E. faecium* M1M10 podría deberse a: (i) que otras bacteriocinas sintetizadas se producen en cantidades mucho menores o no se purifican adecuadamente, (ii) que los genes estructurales permanecen silenciados y/o, (iii) que su producción se encuentra regulada por mecanismos moleculares todavía desconocidos.

Igualmente, la purificación de la actividad antimicrobiana de *E. faecium* M3K31 permitió incrementar 897 veces su actividad antimicrobiana específica y la recuperación de un 11% de su actividad antimicrobiana inicial. El análisis por MALDI-TOF MS de la fracción purificada permitió la identificación de un fragmento peptídico mayoritario de 4.328,1 Da (Figura III.2B). Sin embargo, la secuenciación *de novo* por MALDI TOF/TOF MS de la fracción peptídica purificada permitió la identificación de un péptido de 27- y otro de 14 aminoácidos (Figura III.2C), idéntica a la secuencia aminoacídica C-terminal de la bacteriocina EntHF producida por cepas de *E. faecium* de diverso origen (GenBank, números de acceso P86183 y KJ442693). La diferencia entre la masa molecular medida de la EntHF (4,328.1 Da) y la calculada (4,330.9 Da), sugiere la existencia de un enlace disulfuro entre las dos cisteínas de la molécula.

En este contexto, se reconoce que la EntHF es idéntica en un 91% a la mundticina KS/enterocina CRL35 (Saavedra et al., 2004; Kawamoto et al., 2005; Feng et al., 2009) y un 90% idéntica a la mundticina L (Feng et al., 2009) y avicina A (Birri et al., 2010). Todas estas bacteriocinas se caracterizan por su elevada actividad antilisteriana e incluso la enterocina CRL35 se ha postulado como un compuesto antimicrobiano alternativo para la prevención *in vivo* de infecciones por *Listeria* spp. (Salvucci et al., 2012). Pero más interesante aún es la

ausencia de la enterocina P (EntP) en la fracción purificada de *E. faecium* M3K31, lo que implica la conveniencia de realización de otros estudios acerca de la regulación de la producción de bacteriocinas en BAL que codifican la síntesis de más de una bacteriocina.

#### **XI.1.7. Actividad antimicrobiana de la enterocina A (EntA) y enterocina HF (EntHF) purificadas a homogeneidad, frente a *Listeria* spp.**

En la Tabla III.7 se muestra la actividad antimicrobiana específica de la EntA y la EntHF purificadas a homogeneidad frente 11 *Listeria* spp., incluyendo *L. monocytogenes*. De los resultados obtenidos se desprende que la actividad antimicrobiana específica de la EntHF frente a la EntA fué de 0,4- a 175-vces mayor para la EntHF respecto a la EntA, con *L. ivanovii* CECT913 como la cepa más sensible a la actividad antimicrobiana de la EntHF. Así pues, aunque la EntA es una de las bacteriocinas más potentes de la clase IIa (Ennahar et al., 2000), la EntHF es aún más potente que la EntA frente a *Listeria* spp.

De la estructura tridimensional (3D) en solución de las bacteriocinas de la clase IIa, del reconocimiento de receptores específicos en las células sensibles y de su modo de acción, se deduce que su región N-terminal es responsable de su unión inicial a las bacterias sensibles mientras su región C-terminal penetra en el interior de las células sensibles, se une a receptores específicos y origina una disrupción de la integridad de la membrana celular, salida de solutos y muerte de las células sensibles (Diep et al., 2007; Kjos et al., 2010). La región C-terminal de las bacteriocinas de la clase IIa también determina su espectro antimicrobiano. Por ello, modificaciones en la composición y secuencia aminoacídica de la región C-terminal pueden modificar el modo de acción de dichas bacteriocinas y la susceptibilidad o sensibilidad de las células sensibles a su actividad antimicrobiana. Así, la EntHF, producida por *E. faecium* M3K31, debería considerarse como una bacteriocina con un elevado potencial biotecnológico primeramente como conservador natural de los alimentos pero también como un agente antimicrobiano con potencial terapéutico en medicina humana y veterinaria. Más aún, ya que la EntHF es un metabolito primario de composición aminoacídica puede considerarse como un compuesto apropiado para el diseño y desarrollo de quimeras con una mayor actividad antimicrobiana y espectro de acción, mediante la utilización y desarrollo de técnicas de bioingeniería peptídica.

Por otro lado, los enterococos cada vez poseen más aceptación como probióticos que mejoran la microbiota intestinal, poseen actividad inmunomoduladora y muestran un efecto protector por la producción de compuestos antimicrobianos (Corr et al., 2009; Riboulet-Bisson et al., 2012). Por ello, de los resultados obtenidos se deduce que *E. faecium* M3K31, productor de la EntHF, sensible a la ampicilina y sin codificar factores potenciales de virulencia debería considerarse como un probiótico seguro para su uso en alimentación animal.

## **XI.2. Clonación y expresión de genes sintéticos que codifican las bacteriocinas de amplio espectro de actividad antimicrobiana SRCAM 602, OR-7, E-760 y L-1007, por *Pichia pastoris***

### **Resumen**

En este trabajo se ha evaluado la clonación y expresión funcional de las bacteriocinas de amplio espectro de actividad antimicrobiana SRCAM 602, OR-7, E-760 y L-1077, por *Pichia pastoris* X-33. Para ello, se diseñaron genes sintéticos derivados de la secuencia aminoacídica conocida de dichas bacteriocinas y con el codón de uso para su expresión por *P. pastoris*, que se clonaron en el vector de expresión proteica pPICZ $\alpha$ A. Los plásmidos recombinantes derivados se linearizaron y transformaron en células competentes de *P. pastoris* X-33. La integración de los plásmidos en el genoma de *P. pastoris* se confirmó por PCR y secuenciación de los insertos. Las levaduras recombinantes no mostraron actividad antimicrobiana directa. No obstante, la purificación de la actividad antimicrobiana presente en los sobrenadantes de los cultivos productores se realizó mediante un procedimiento multicromatográfico, basado en la precipitación de las proteínas o péptidos con sulfato amónico, desalado por columnas de filtración en gel y posterior purificación de los eluatos por columnas de intercambio catiónico, interacción hidrofóbica y de fase reversa, esta última acoplada a un equipo de Cromatografía Líquida Rápida (RP-FPLC). Sin embargo, la actividad antimicrobiana de las fracciones purificadas sólo pudo observarse en los eluatos resultantes de su purificación por interacción hidrofóbica y RP-FPLC. El análisis por MALDI-TOF MS de las fracciones purificadas por RP-FPLC revelaron la presencia de fragmentos peptídicos de menor y mayor masa molecular que la deducida de su secuencia aminoacídica. El análisis por MALDI TOF/TOF de las fracciones con actividad antimicrobiana purificadas por RP-FPLC indican la presencia en las mismas de fragmentos peptídicos, no relacionados con la secuencia aminoacídica de las bacteriocinas clonadas.

### **XI.2.1. Clonación de los genes sintéticos que codifican la síntesis de diversas bacteriocinas y evaluación de su expresión funcional por *P. pastoris* X-33**

La construcción de genes sintéticos deducidos de la secuencia aminoacídica conocida de las bacteriocinas SRCAM 602, OR-7, E-760 y L-1077 y su posterior clonación en el vector de expresión proteica pPICZ $\alpha$ A que incluye un promotor fuertemente inducible por metanol y la señal de corte kex2, originó los plásmidos recombinantes pSRCAM602, pOR-7, pE-760 y pL-1077 (Tabla IV.1). A su vez, la transferencia por transformación de los plásmidos recombinantes a células competentes de *P. pastoris* X-33 generó las levaduras recombinantes *P. pastoris* X-33SRCAM602 (*srcam602*), *P. pastoris*X-33OR-7 (*or-7*), *P. pastoris*X-33E-760 (*e-760*), y *P. pastoris* X-33L-1077 (*l-1077*). Sin embargo, ninguna de las levaduras recombinantes incluidas las seleccionadas por su elevada resistencia a zeocina (1.000  $\mu$ g/mL), mostraron actividad antimicrobiana directa mediante la técnica de cultivo de estría en placa frente a *P. damnosus* CECT4797 como el microorganismo indicador. Colonias de *P. pastoris* X-33 y *P. pastoris* X-33 (pPICZ $\alpha$ A), se utilizaron como controles negativos de producción de las bacteriocinas de interés.



### **XI.2.2. Purificación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de las levaduras recombinantes, análisis por espectrometría de masas y determinación de su actividad antimicrobiana**

Solamente los sobrenadantes purificados por un procedimiento multicromatográfico, mostraron una actividad antimicrobiana cuantificable frente a *P. damnosus* CECT4797, mediante un ensayo en placas microtituladoras (Table IV.4), pero en ningún caso frente a *L. monocytogenes* CECT4032, *E. coli* O157:H7, *Y. ruckeri* LMG3279, *C. jejuni* ATCC33560 o *C. jejuni* NCTC11168. La cepa de *P. pastoris* X-33SRCAM602 fue la de mayor actividad antimicrobiana. Los sobrenadantes purificados de las cepas de *P. pastoris* X-33 y *P. pastoris* X-33 (pPICZ $\alpha$ A), empleadas como controles, tampoco mostraron actividad antimicrobiana.

La producción de bacteriocinas en hospedadores microbianos heterólogos puede ofrecer ventajas frente a los productores nativos, facilitando su expresión y elevando su producción. Diversas levaduras se han utilizado como plataformas de producción y expresión heteróloga de proteínas con rendimientos de producción variables (Böer et al., 2007; Borrero et al., 2012a; Ahmad et al., 2014), desde niveles de producción muy altos a niveles muy bajos o no detectables (Burrowes et al., 2005; Love et al., 2012; Yang et al., 2013). Igualmente, la exitosa producción heteróloga de la enterocina P (EntP) (Gutiérrez et al., 2005), la hiracina JM79 (HirJM79) (Sánchez et al., 2008) y la enterocina A (EntA) (Borrero et al., 2012) contrasta con la escasa actividad antimicrobiana de la sakacina A (Sak A) y la quimera EntP/SakA, producidas por *P. pastoris* y *Kluyveromyces lactis* (Jiménez et al., 2013).

Entre los factores que pueden afectar la síntesis y secreción de proteínas por levaduras, merecen destacarse el número de copias del gen foráneo integradas en el genoma de la levadura, la estabilidad del ARNm, errores en la traducción, secreción, plegamiento o translocación de la proteína o la actividad de proteasas en la proteína de interés (Kang et al., 2000; Werten et al., 2005; Ni et al., 2008). La secuencia aminoacídica tras la señal de secreción Kex2 y, en concreto, la posición Kex2 P1' también puede interferir en la secreción de las proteínas recombinantes (Yang et al., 2013). Para las bacteriocinas SRCAM 602, OR-7, E-760 y L-1077 los aminoácidos en posición Kex2 P1' fueron A, K, N y T, respectivamente (Tabla IV.6), mientras los aminoácidos en esta posición en las bacteriocinas EntA y EntP, producidas en niveles elevados y expresadas funcionalmente por *P. pastoris*, también fueron A y T (Gutiérrez et al., 2005; Borrero et al., 2012a). Otro de los puntos críticos es la incapacidad de la proteína recombinante de adoptar una estructura funcional apropiada o su posible acumulación en el retículo endoplásmico (RE) originando una degradación asociada al RE, estrés, niveles bajos de secreción y, finalmente, apoptosis de la levadura productora (Gasser et al., 2008; Stolz et al., 2010; Love et al., 2012; Jiménez et al., 2013).

La recuperación o incremento de la actividad antimicrobiana de fracciones purificadas tras sucesivas cromatografías, se ha observado también durante la purificación a homogeneidad de la garvicina ML, producida por *Lactococcus garvieae* DCC43 (Borrero et al., 2011), y puede deberse a la eliminación de inhibidores, desagregación de las bacteriocinas o cambios en la conformación de las bacteriocinas en los solventes utilizados. Sin embargo, el análisis por MALDI-TOF MS de los sobrenadantes purificados reveló fragmentos peptídicos con masas

moleculares diferentes a las masas moleculares teóricas deducidas de su secuencia aminoacídica. En la fracción purificada de *P. pastoris* X-33SRCAM602 se observó un fragmento peptídico mayoritario de 3.388,8 Da (Figura IV.1(a)) y en la de *P. pastoris* X-33OR-7 numerosos fragmentos peptídicos de una masa molecular variable (Figura IV.1(b)). Igualmente, las fracciones purificadas con actividad antimicrobiana procedentes de *P. pastoris* X-33E-760 y *P. pastoris* X-33L-1077 mostraron un espectro variable de fragmentos peptídicos de un tamaño molecular diferente de los deducidos de las bacteriocinas clonadas (Figuras IV.1 (c)(d)). Es posible que péptidos del medio de cultivo o del metabolismo celular pudiesen agregar o coeluir con las bacteriocinas purificadas y ser responsables de la actividad antimicrobiana de las fracciones purificadas evaluadas frente a *P. damnosus* CECT4797. O que la actividad antimicrobiana observada proceda de péptidos bioactivos no caracterizados todavía, encriptados en la secuencia aminoacídica de proteínas de los componentes del medio de cultivo de desarrollo de las levaduras recombinantes.

La ausencia de las bacteriocinas clonadas en las fracciones purificadas también podría relacionarse con la existencia de bacteriocinas truncadas, interacción de las misma con otras moléculas, modificaciones posttraduccionales (Zhao et al., 2009; Jiménez et al., 2013, 2014) o niveles de síntesis y secreción muy bajos o no detectables, ya que las bacteriocinas son activas a concentraciones nanomolares (Breukink et al., 1999). También conviene conocer que las bacteriocinas de amplio espectro SRCAM 602 (Svetoch et al., 2005), OR-7 (Stern et al., 2006), E-760 (Line et al., 2008) y L-1077 (Svetoch et al., 2008) no han sido todavía plenamente caracterizadas bioquímica ni genéticamente. Estudios recientes no han podido detectar la bacteriocina SRCAM 602 en los sobrenadantes de *Paenibacillus polymyxa* NRRL B-30509, productor natural de la misma ni tampoco su gen estructural por PCR o por secuenciación del genoma de la cepa productora (Lohans et al., 2012). Igualmente, *Bacillus circulans* (*Paenibacillus terrae*) NRRL B-30644 microorganismo descrito como productor de la bacteriocina SRCAM 1580 activa frente a *C. jejuni* (Svetoch et al., 2005), tampoco parece producir dicha bacteriocina ni se han identificado sus determinantes genéticos en su genoma. Su actividad frente *C. jejuni* puede ser debida a la síntesis y secreción del lipopéptido tridecaptina A1. Además, esta cepa también produce el lantibiótico paenicidina B, activo frente a bacterias Gram-positivas (Lohans et al., 2014).

En cualquier caso, la purificación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de las cepas de *P. pastoris* X-33SRCAM602 (*srcam602*), *P. pastoris*X-33OR-7 (*or-7*), *P. pastoris*X-33E-760 (*e-760*), y *P. pastoris* X-33L-1077 (*l-1077*) y el análisis por MALDI TOF/TOF de las fracciones purificadas con actividad antimicrobiana, reveló que las secuencias aminoacídicas deducidas de los péptidos purificados no formaban parte de la secuencia aminoacídica de las bacteriocinas clonadas (Tabla IV.5) y que dichas secuencias se encontraban encriptadas en transportadores ABC, proteínas de la familia de las histidina kinasas, proteínas de la superfamilia de peptidasas C1 y en proteínas de unión al nucleosoma.

Aunque la clonación en levaduras recombinantes de genes sintéticos que codifican la síntesis de bacteriocinas dirige la producción, actividad antimicrobiana y actividad antimicrobiana específica de las bacteriocinas clonadas en ausencia de proteínas dedicadas de inmunidad y secreción (Jiménez et al., 2014), los resultados descritos contrastan con la escasa actividad

antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas de los sobrenadantes purificados de las levaduras recombinantes de *P. pastoris* que codifican las bacteriocinas SRCAM 602, OR-7, E-760 y L-1077. Ya que la producción de bacteriocinas a partir de genes sintéticos es difícil de predecir, quizás sea necesario un mayor esfuerzo investigador que permita una más eficaz producción y expresión funcional de otros genes sintéticos y sus quimeras por levaduras recombinantes. Todo esfuerzo investigador dirigido a evaluar la producción y expresión funcional de bacteriocinas por levaduras debería facilitar sus aplicaciones biotecnológicas como agentes antimicrobianos naturales en la industria alimentaria, medicina humana y veterinaria y en producción animal.

### **XI.3. Estructura tridimensional (3D) en solución de la enterocina HF, una bacteriocina con elevada actividad antilisteriana producida por *Enterococcus faecium* M3K31**

#### **Resumen**

En este trabajo se han utilizado técnicas de dicroísmo circular (DC) y de resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$ -RMN) para determinar la estructura tridimensional (3D) en solución de la enterocina HF (EntHF), una bacteriocina de 43 aminoácidos de la clase IIa producida por *E. faecium* M3K31. La EntHF purificada se mostró desestructurada en agua, pero los análisis por DC demostraron que la EntHF adoptó una conformación en hélice alfa con concentraciones crecientes de trifluoroetanol (TFE). Además, los estudios espectroscópicos por RMN sugieren que la bacteriocina adopta la forma de lámina beta antiparalela en su región N-terminal (residuos 1-17), seguida de una hélice alfa bien definida en la región central (residuos 19-30) y de una región C-terminal más desordenada o desestructurada (residuos 31-43). Los resultados obtenidos sugieren que la EntHF posee tres dominios estructurales diferenciados que podrían actuar de manera coordinada. La estructura descrita concuerda con la ausencia de señales de larga distancia de efecto nuclear Overhauser (NOE) entre el dominio N-terminal y el C-terminal de la bacteriocina. Finalmente, la estructura tridimensional (3D) en solución, determinada para la bacteriocina EntHF, se ajusta al conocimiento generado acerca del reconocimiento de receptores y modo de acción de las bacteriocinas de la clase IIa.

#### **XI.3.1. Purificación de la bacteriocina, dicroísmo circular (DC) y resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$ -RMN)**

La EntHF se purificó por cromatografías de intercambio catiónico e interacción hidrofóbica y su purificación a homogeneidad se confirmó por MALDI-TOF MS ( $[\text{M}+\text{H}]^+ = 4,328.1$ ). Para determinar su estructura secundaria y las condiciones óptimas para la resonancia magnética nuclear (RMN), la bacteriocina se analizó mediante dicroísmo circular (DC) con trifluoroetanol (TFE) como el solvente simulador de las condiciones de las membranas. La EntHF se mostró desestructurada en agua pero adoptó una conformación en hélice alfa (20%) con concentraciones crecientes de TFE, sin diferencias significativas entre un 50 y un 75% de solvente (Figura V.1). Por ello, la bacteriocina purificada se disolvió en un 50% de TFE para

su análisis por RMN.

La RMN se realizó en dos pasos. Primero se identificaron los aminoácidos de la bacteriocina que contienen patrones característicos de picos de cruce en el espectro TOCSY (del inglés, *Total Correlation Spectroscopy*). Posteriormente, se determinó la conectividad secuencial entre aminoácidos en el espectro NOESY (del inglés, *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) a través de los picos de cruce que resultan de la interacción a través del espacio, entre los protones amídicos de la cadena principal NH de un aminoácido (i) con su homólogo del residuo aminoacídico siguiente NH (i+1) o bien, entre este último protón amídico NH (i+1) con los protones H $\alpha$ , H $\beta$ , H $\gamma$ , H $\delta$  del residuo anterior (i). Todas las conectividades secuenciales entre protones amídicos pudieron establecerse mientras que los desplazamientos químicos de los protones de las ramificaciones de la lisina 38 (K38) y la lisina 42 (K42) no pudieron determinarse debido al solapamiento de señales.

Los desplazamientos químicos para cada sistema de espín se asignaron a través del espectro TOCSY mediante picos de cruce NOE a residuos adyacentes NHNH (i, i+1),  $\delta$ NH (i, i+1) y  $\delta$ NH (i, i+1) y de forma manual. De los resultados generados se obtuvieron dos listas: (1) con los desplazamientos químicos de cada uno de los protones de los aminoácidos de la proteína y (2) con el número de picos de cruce NOE asignados entre aminoácidos. La estructura de la EntHF se calculó utilizando el programa CYANA 2.1. Los espectros obtenidos se procesaron con NMRPipe y se analizaron, asignaron e interpretaron con NMRview. Los desplazamientos químicos pueden observarse en la Tabla V.S1, los diagramas de Ramachandran en la Figura V.S2, la estadística de los cálculos de la estructura en la Tabla V.1 y la región de la huella dactilar de espectro, en la Figura V.S3.

Gracias a la buena dispersión de los protones amida y a la ausencia de solapamiento en los espectros TOCSY y NOESY, la estructura tridimensional (3D) de la EntHF se resolvió desde una perspectiva homonuclear y sin marcado isotópico. En este contexto, también es importante destacar que *E. faecium* M3K31 no fue capaz de desarrollarse en el medio enriquecido con  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  Celtone® Complete Growth Medium (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) lo que, de no ocurrir lo descrito en la frase anterior, hubiera complicado extremadamente la determinación de la estructura 3D de la EntHF.

Como era predecible de los análisis por DC, los resultados de RMN confirmaron que la EntHF adopta una estructura de lámina beta antiparalela en su región N-terminal con abundantes NOEs de media y larga distancia (p. ej. Tyr3 NH a Val7 H $\gamma$ , Val7 H $\alpha$  a Ser15 NH) y el puente disulfuro formado entre las cisteínas 9 (C9) y 14 (C14). Los resultados obtenidos también demostraron que en la zona central del péptido, entre los residuos 19 y 30, se origina una hélice alfa anfipática bien definida (RMSD 0.63 Å), consistente con las señales NOE típicas de las hélices alfa identificadas (p. ej.,  $\alpha\text{H-NH}(i, i+3)$ ,  $\alpha\text{H-}\beta\text{H}(i, i+3)$ ). No obstante, la cola C-terminal (residuos 31-43) se mostró más desorganizada y desestructurada. La estructura tridimensional (3D) determinada de la EntHF se muestra en la Figura V.2A,B.

Por otra parte, los mapas de potencial electrostático sugieren que la superficie de la EntHF es catiónica (Figura V.2C), aunque también se observan zonas sin carga. Las 6 lisinas de su

secuencia aminoacídica contribuyen al carácter catiónico de la bacteriocina y los mapas de superficie hidrofóbica muestran su carácter anfipático (Figura V.2D), con áreas hidrófilas e hidrófobas.

Igualmente, el solapamiento de las 20 estructuras calculadas por CYANA no mostró una estructura muy definida, lo que sugiere que las regiones N-terminal en forma de lámina beta, la hélice alfa central y la región C-terminal, son flexibles e independientes entre ellas (Figura V.3, Figura V.S4). Además, la ausencia de picos de cruce NOE entre la región N-terminal y la hélice alfa central sugieren que el ácido aspártico 17 (D17) puede estar haciendo de bisagra entre estas dos regiones. En este sentido, tampoco se detectaron NOEs entre la región central y C-terminal de la EntHF.

Otras bacteriocinas de la clase IIa cuya estructura tridimensional (3D) también se ha resuelto se muestran desestructuradas en agua pero adoptan estructuras secundarias cuando se exponen a solventes que simulan las condiciones de las membranas celulares (Gallagher et al., 1997; Wang et al. 1999; Uteng et al., 2003; Haugen et al., 2005; Nissen-Meyer et al., 2009). Por ello, se conoce que la sakacina P (SakP) y la leucocina A (LeuA) adoptan una lámina beta antiparalela en su región N-terminal estabilizada por un puente disulfuro entre los aminoácidos C9 y C14. A continuación, ambas bacteriocinas muestran una hélice alfa central que termina en una región C-terminal, a modo de horquilla, que regresa hacia la región central (Uteng et al., 2003; Nissen-Meyer et al., 2009). Por su parte, la carnobacteriocina B2 (CbnB2) muestra una región en hélice alfa central, flanqueada por dominios N- y C-terminales más desestructurados. La curvacina A (CurA) posee un dominio N-terminal en forma de lámina beta seguido por una estructura C-terminal hélice-bisagra-hélice (Wang et al. 1999; Haugen et al., 2005).

La ausencia de horquilla terminal en la EntHF, presente en la SakP (72% de homología) o la LeuA (41% de homología) fue, no obstante, inesperada. Sin embargo el empleo de distintos solventes (TFE o micelas DPC) para simular las condiciones de la membrana ya mostró diferencias en la estructura tridimensional de la SakP y la LeuA (Gallagher et al., 1997; Uteng et al., 2003). Ambas mostraron la horquilla terminal en presencia de DPC pero no con TFE. Esta horquilla se encuentra estabilizada en algunas bacteriocinas por un segundo puente disulfuro en la región C-terminal como en la enterocina A, pediocina PA-1 o divercina V41. Sin embargo, la mayoría de bacteriocinas de la clase IIa no tiene este puente disulfuro y, en su lugar poseen un triptófano, que parece ayudar en el posicionamiento de la bacteriocina en la membrana de las células sensibles (Fimland et al., 2002).

De lo descrito se deduce que, aunque las bacteriocinas de la clase IIa no comparten una estructura tridimensional (3D) común, todas poseen dos dominios diferenciados separados por una bisagra flexible. El primer dominio consiste de una región N-terminal catiónica y muy conservada estructurada en forma de lámina beta antiparalela estabilizada por un puente disulfuro y, un segundo dominio, menos conservado con una o dos hélices alfa que forman una horquilla o una estructura funcional equivalente hélice-bisagra-hélice.

La EntHF es una bacteriocina de la clase IIa con un enlace disulfuro en su región N-terminal

(C9-C14) y un triptófano en la posición 41 (W41) mostrando, además, una elevada similitud con otras bacteriocinas de la clase IIa cuya estructura tridimensional (3D) se desconoce todavía (Tabla V.2). En este contexto, se conoce que la secuencia aminoacídica de la EntHF madura es 91% idéntica a la mundticina KS/enterocina CRL35 (Kawamoto et al., 2002; Saavedra et al., 2004) y un 90% idéntica con la mundticina L (Feng et al., 2009) y la avicina A (Birri et al., 2010). Todas estas bacteriocinas se caracterizan por su elevada actividad antilisteriana y su posible empleo como péptidos antimicrobianos naturales para reducir la presencia de *Listeria* spp. no solamente en alimentos sino, también, para reducir la incidencia de *Listeria* spp. *in vivo* en hospedadores infectados (Salvucci et al., 2012).

Se ha hipotetizado que debido a su elevada especificidad la mayoría, si no todas, las bacteriocinas de la clase IIa utilizan moléculas receptoras específicas en las células sensibles para inducir la formación de poros o modificar la integridad de las membranas celulares (Kaur et al., 2004; Fimland et al., 2005). Sin embargo, hasta ahora los únicos receptores identificados han sido proteínas del sistema de transporte de azúcares manosa-fosfotransferasa (Man-PTS) para bacteriocinas de la clase IIa y bacteriocinas de la clase IID, lactococinas A y B (Diep et al., 2007; Kjos et al., 2010); la proteína de membrana undecaprenol pirofosfato fosfatasa involucrada en la síntesis del peptidoglicano y diana de bacteriocinas cuya actividad se debe a la actividad conjunta de dos péptidos, como lactococina G y enterocina 1071 (Kjos et al., 2011); el transportador ABC-maltosa reconocido por la bacteriocina circular garvicina ML (Gabrielsen et al., 2012) y, una metaloendopeptidasa dependiente de zinc como diana de la bacteriocina sin secuencia líder LsbB y, posiblemente, de otras bacteriocinas sin secuencia líder con regiones C-terminales homólogas (Uzelac et al., 2013; Ovchinikov et al., 2014).

Igualmente, para las bacteriocinas de la clase IIa se ha propuesto que su dominio N-terminal lámina beta facilita su adhesión inicial a las células sensibles (Fimland et al., 2005, 2009), mientras la región central hélice alfa penetra a través de la zona hidrofóbica de la membrana, permitiendo la interacción de la bacteriocina con los dominios IIC y IID de proteínas del sistema sistema manosa fosfotransferasa (Man-PTS), alterando la integridad de las membranas celulares, originando la pérdida de solutos y causando la muerte de las células sensibles (Diep et al., 2007; Kjos et al., 2010). No obstante, estudios con análogos sintéticos han demostrado que la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas depende de su secuencia aminoacídica completa y que la tolerancia a modificaciones en la secuencia de aminoácidos de su región N-terminal, así como su papel en la actividad antimicrobiana no se conocen completamente (Sit et al., 2012).

Por otra parte, aunque la interacción detallada de los aminoácidos de la región C-terminal de las bacteriocinas de la clase IIa con sus receptores específicos todavía no se conoce bien, su interacción con los dominios C y D de las permeasas Man-PTS también parece depender de su secuencia aminoacídica (Haugen et al., 2005; Diep et al., 2007; Kjos et al., 2010). Algunos aminoácidos son más importantes que otros en esta interacción. El dominio C-terminal de las bacteriocinas de la clase IIa también está involucrado en su reconocimiento por las proteínas de inmunidad y determina su espectro antimicrobiano (Johnsen et al., 2004; Kjos et al., 2011). También es importante destacar que las permeasas del sistema Man-PTS no se sintetizan por eucariotas, por lo que las bacteriocinas de la clase IIa se consideran péptidos antimicrobianos

ideales para inactivar bacterias patógenas sensibles sin afectar al hospedador (Kjos et al., 2011).

Como se ha comentado previamente, las interacciones entre los aminoácidos de la región C-terminal de las bacteriocinas de la clase IIa y sus receptores específicos todavía no se conocen bien. A su vez, las diferencias observadas en la estructura tridimensional (3D) de bacteriocinas de la clase IIa, incluyendo la EntHF, podrían también deberse a las condiciones experimentales en las que se determinó su estructura como solventes utilizados, micelas, temperatura, condiciones de RNM así como, obviamente, a la composición y secuencia aminoacídica de la bacteriocina evaluada (Kaur et al., 2004). Las diferencias observadas podrían ser útiles para evaluar análogos sintéticos que arrojen luz sobre la tolerancia a los cambios y posible alteración del espectro antimicrobiano de las bacteriocinas de la clase IIa y, conocer así, más detalladamente, el modo de acción de estos péptidos antimicrobianos. Así, modificaciones en la región C-terminal de estas bacteriocinas pueden modificar la forma de interactuar con el receptor. Esta hipótesis explicaría, en parte, por qué la actividad antimicrobiana de bacteriocinas con secuencias aminoacídicas similares manifiestan espectros de actividad antimicrobiana tan diferentes.

En cualquier caso, un conocimiento cada vez mayor de la estructura tridimensional (3D) de las bacteriocinas de la clase IIa, permitirá reconocer mejor su interacción con receptores bacterianos específicos y sus relaciones estructura-actividad actividad antimicrobiana, sentando las bases para un uso racional, seguro y eficiente de estos péptidos antimicrobianos. Además, ya que las bacteriocinas de la clase IIa son metabolitos peptídicos primarios de naturaleza lineal, todas ellas permiten y facilitan el diseño de nuevas bacteriocinas o de quimeras de bacteriocinas con mayor actividad antimicrobiana y espectro de acción por técnicas de bioingeniería peptídica.

#### **XI.4. Determinación de la secuencia genómica de *Enterococcus faecium* M3K31, productora de bacteriocinas y aislada de buitres leonados (*Gyps fulvus* subesp. *fulvus*)**

##### ***Resumen***

*Enterococcus faecium* M3K31 es una bacteria láctica (BAL) bacteriocinogénica, aislada de heces de buitres leonados (*Gyps fulvus* subsp. *fulvus*). La determinación de la secuencia de su genoma proporciona una información genética valiosa que, además, respalda su potencial biotecnológico.

La cepa de *E. faecium* M3K31, aislada de buitres leonados (*Gyps fulvus* subesp. *fulvus*), se caracteriza por su elevada actividad antimicrobiana frente a *Listeria* spp., por producir la bacteriocina enterocina HF (EntHF) y por la escasa presencia o ausencia de genes que sintetizan factores potenciales de virulencia (Arbulu et al., 2015; Arbulu et al., manuscrito en revisión). La determinación de la secuencia del genoma de *E. faecium* M3K31 mediante la plataforma de secuenciación masiva Illumina MiSeq, permitió concentrar las secuencias obtenidas en 70 marcos (en inglés, *contigs*) para un total de 2.722.557 pb, con un contenido

de G+C del 38,1%. El análisis *in silico* de las secuencias nucleotídicas resultantes mediante el software BAGEL3 (Van Heel et al., 2013), confirmó análisis previos por PCR determinando que *E. faecium* M3K31 codifica un número de genes (en inglés, *cluster*) incluyendo el gen estructural de la EntHF (GenBank, números de acceso P86183 y KJ442693), los genes estructural y de inmunidad de la enterocina P (EntP) (Cintas et al., 1997) y el gen estructural que codifica un péptido 85% idéntico a la bacteriocina SRCAM 602 (GenBank, número de acceso ELB21426) (Svetoch et al., 2005; Lohans et al., 2012). Los genes responsables de la síntesis de cada bacteriocina se localizaron en tres *contigs* diferentes. Como genes responsables de la resistencia de los enterococos a antibióticos solamente se identificó el gen de resistencia a rifampicina (*rpoB*). En la secuencia genómica resultante no se identificó la presencia de ningún otro gen de resistencia a antibióticos ni de factores potenciales de virulencia, asociados a otras cepas de *E. faecium* (Sánchez et al., 2007).

La determinación de la secuencia genómica de *E. faecium* M3K31 también ha confirmado resultados previos por PCR (Capítulo III) de ausencia de la secuencia de inserción *IS26*, de ausencia del gen (*esp*) que codifica la proteína de superficie de enterococos (Esp) y de ausencia del gen (*hly<sub>Efm</sub>*) que codifica la enzima glicosil hidrolasa, como requerimientos de la EFSA para su empleo como un probiótico seguro en nutrición animal (EFSA, 2012). De gran interés ha sido también la identificación en el genoma de *E. faecium* M3K31, mediante la herramienta CRISPFinder (Grissa et al., 2007), de una repetición palindrómica corta agrupada y regularmente interespaciada de nucleótidos (CRISPR, del inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), considerada como una barrera de resistencia a agentes externos como plásmidos y bacteriófagos y como una forma de inmunidad adquirida.

La elevada actividad antimicrobiana de *E. faecium* M3K31 (Capítulo III), atribuida a la producción de EntHF y cuya estructura tridimensional (3D) también se ha resuelto (Capítulo IV) y la ausencia de genes que codifican resistencias a antibióticos y factores potenciales de virulencia destacables, confieren a este enterococo un elevado potencial biotecnológico. Igualmente, la determinación de la secuencia genómica de *E. faecium* M3K31 refuerza su potencial como productor de una bacteriocina potencialmente útil como conservador natural de los alimentos y con un elevado potencial terapéutico en medicina humana y veterinaria, así como un probiótico seguro para su empleo en nutrición animal.

### **XI.5. Clonación y expresión de genes sintéticos que codifican bacteriocinas de la clase IIa nativas, bacteriocinas híbridas y bacteriocinas quimeras, por *Pichia pastoris***

#### **Resumen**

En este trabajo genes sintéticos diseñados de la (a), secuencia aminoacídica conocida de bacteriocinas de la clase IIa enterocina HF (EntHF) y enterocina CRL35 (EntCRL35), (b) de bacteriocinas híbridas derivadas de la fusión de la enterocina A (EntA) consigo misma, con la EntHF y con la EntCRL35 mediante un péptido bisagra de tres glicinas, y (c) de bacteriocinas quimeras derivadas de la fusión de la región N-terminal de la EntA y la enterocina P (EntP) con la región C-terminal de la EntHF y la EntCRL35, se clonaron en el vector de expresión



proteína pPICZαA para su transferencia por transformación en *P. pastoris* X-33. El vector de expresión proteica pP-αhSUMO3 también se empleó para la clonación de *entHF* y *entCRL35* y expresión de las bacteriocinas fusionadas a la proteína hSUMO3, por *P. pastoris*. Sin embargo, ninguna de las levaduras recombinantes, derivadas de *P. pastoris* X-33 y que codificaban bacteriocinas nativas o híbridas, mostró actividad antimicrobiana en sus sobrenadantes. Solamente las levaduras recombinantes que expresaban bacteriocinas quimeras, pero no las bacteriocinas fusionadas a la proteína hSUMO3, mostraron actividad antimicrobiana. La levadura *P. pastoris* X-33, productora de la quimera EntP::EntHF, mostró la mayor actividad antimicrobiana en sus sobrenadantes y en las fracciones eluidas resultantes de la purificación de la quimera por un procedimiento multicromatográfico. El análisis por MALDI-TOF MS de las fracciones purificadas de los sobrenadantes de las levaduras productoras de bacteriocinas nativas, bacteriocinas híbridas y bacteriocinas quimeras, así como de las productoras de bacteriocinas fusionadas a la proteína hSUMO3, no permitió la determinación en las muestras de bacteriocinas con la masa molecular esperada de las bacteriocinas producidas. Sin embargo, el análisis de las muestras purificadas por MRM-ESI-LC-MS/MS (QTRAP) permitió la determinación en las muestras de las bacteriocinas presentes en las muestras purificadas. Los resultados descritos sugieren que la región N-terminal de las bacteriocinas EntA y EntP dirigen el procesamiento y secreción de bacteriocinas híbridas y bacteriocinas quimeras, producidas por *P. pastoris*. Además, la comparación de la actividad antimicrobiana de la quimera EntP::EntHF respecto de la actividad de la EntP::EntHF<sub>sint</sub>, sugiere que la bacteriocina recombinante manifiesta mayor actividad antimicrobiana específica que la bacteriocina sintética frente a diversas *Listeria* spp. incluyendo *L. monocytogenes*. No obstante, la producción recombinante de bacteriocinas quimeras parece menor de lo esperado y su purificación a homogeneidad, otro de los aspectos a optimizar y mejorar.

#### **XI.5.1. Clonación y expresión funcional de genes sintéticos que codifican bacteriocinas nativas, bacteriocinas híbridas y bacteriocinas quimeras**

En este trabajo se ha explorado el potencial de *P. pastoris* como productor de bacteriocinas de la clase IIa nativas, bacteriocinas híbridas y bacteriocinas quimeras, caracterizadas por su elevada actividad antilisteriana. La levadura *P. pastoris*, actualmente reclasificada como *Komagataella pastoris* se ha desarrollado como una plataforma de expresión de proteínas a gran escala (Cregg et al., 2000; Weinacker et al., 2014). Pese a que las bacteriocinas de la clase IIa comparten un alto grado de similitud (40-60%), a día de hoy sólo las bacteriocinas enterocina A (EntA), enterocina P (EntP) e hiracina JM79 (Hir79) se han producido con éxito por levaduras, incluyendo *P. pastoris* X-33 (Gutiérrez et al., 2005; Sánchez et al., 2008; Borrero et al., 2012; Jiménez et al., 2013; Jiménez et al., 2014). En este trabajo, además de la producción de las bacteriocinas nativas EntHF y EntCRL35 se ha evaluado el potencial de la EntA como péptido lanzadera para la producción de bacteriocinas híbridas fusionadas a la EntA mediante un tripéptido (tri-Gly), mientras las bacteriocinas quimeras se diseñaron derivadas de la fusión de la región N-terminal de las bacteriocinas EntA y la EntP con la región C-terminal de las bacteriocinas EntHF y EntCRL35 (Tabla VII.1).

La clonación de genes sintéticos diseñados de la secuencia aminoacídica de las bacteriocinas nativas (EntHF y EntCRL35), de las bacteriocinas híbridas (EntA::L::EntA, EntA::L::EntHF y EntA::L::EntCRL35) y de las bacteriocinas quimeras (EntA::EntHF, EntA::EntCRL35, EntP::EntHF and EntP::EntCRL35) en el vector de expresión pPICZαA y con el codón de uso para su expresión por *P. pastoris*, generó los plásmidos recombinantes pEntHF, pEntCRL35, pEntA::L::EntA, pEntA::L::pEntHF, pEntA::L::EntCRL35, pEntA::EntHF, pEntA::EntCRL35, pEntP::EntHF y pEntP::EntCRL35 (Tabla VII.2). Igualmente, la clonación de los genes sintéticos *entHF* y *entCRL35* en el vector de expresión pP-αhSUMO3, generó los plásmidos recombinantes pP-αhSUMO3-EntHF y pP-hαSUMO3-EntCRL35. Los plásmidos linearizados se transformaron en células competentes de *P. pastoris* X-33, permitiendo el aislamiento de clones resistentes a zeocina.

No obstante, ninguna de las levaduras recombinantes derivadas de *P. pastoris* X-33 y que codificaban las bacteriocinas nativas o híbridas, mostró actividad antimicrobiana directa frente a *P. damnosus* CECT4797 mediante el test de estría en agar. Sin embargo, *P. pastoris* X-33EntA::EntHF (2.2%, 2 colonias de 90), *P. pastoris* X-33EntP::EntHF (32.5%, 39 colonias de 120) y *P. pastoris* X-33EntP::EntCRL35 (18.3%, 22 colonias de 120) si que mostraron actividad antimicrobiana directa frente a *P. damnosus* CECT4797 (resultados no mostrados). Las levaduras recombinantes seleccionadas por su elevada resistencia a zeocina 1.000 µg/mL mostraron mayor actividad antimicrobiana que las seleccionadas con 100 µg/mL de zeocina. Por otra parte, ninguna de las levaduras recombinantes derivadas de *P. pastoris* X33 y que codificaban las proteínas de fusión hSUMO3-EntHF y hSUMO3-EntCRL35, mostraron actividad antimicrobiana directa mediante el test de estría en agar.

Como ya se ha comentado en otras secciones de este trabajo la producción heteróloga de proteínas por *P. pastoris* se considera variable (Love et al., 2012; Arbulu et al., 2015; Yang et al., 2013). También se conoce que diversos factores afectan la producción de proteínas por hospedadores heterólogos como el número de copias del vector integradas en el genoma, estabilidad del ARNm, errores en la traducción, síntesis descoordinada de proteínas, modificaciones en el plegamiento y traslocación de las proteínas sintetizadas o proteólisis de las proteínas sintetizadas por proteasas endógenas o por proteasas liberadas al medio extracelular, asociadas a la pared celular o liberadas al medio de cultivo como consecuencia de la disrupción celular (Ni et al., 2008). El vector de expresión pPICZαA contiene un promotor fuertemente inducible y la señal de secreción Kex2. Estudios previos también han demostrado la importancia de la secuencia aminoacídica que sigue a la señal de secreción Kex2, por su importancia en la síntesis de proteínas (Yang et al., 2013; Jiménez et al., 2013). En concreto, el residuo en posición Kex2 P1' parece interferir en la secreción de las proteínas fusionadas. En el caso de las bacteriocinas nativas EntHF y EntCRL35 este aminoácido era Lys (K) en ambos casos, mientras que en la EntA y EntP, producidas con éxito por *P. pastoris*, estos aminoácidos fueron Thr (T) y Ala (A), respectivamente (Tabla VII.1).

#### **XI.5.2. Producción y purificación de las bacteriocinas de los sobrenadantes de las cepas recombinantes de *P. pastoris* X-33**

Las cepas recombinantes de *P. pastoris* X-33 que codificaban las bacteriocinas nativas, bacteriocinas híbridas y bacteriocinas quimeras (Tabla VII.4), se desarrollaron en el medio complejo BMMY con metanol para inducir su síntesis y proceder a su purificación a homogeneidad. No obstante, en el caso de las bacteriocinas nativas e híbridas no se detectó actividad antimicrobiana en sus sobrenadantes, ni mediante un test de difusión en agar ni mediante placas de microtitulación. Sin embargo, los sobrenadantes libres de células de *P. pastoris* X-33 productoras de bacteriocinas quimeras sí que mostraron actividad antimicrobiana, mediante un test de difusión en agar frente a *P. damnosus* CECT4797 (Figura VII.1). Cuando las bacteriocinas potencialmente presentes en los sobrenadantes de todas las levaduras recombinantes se purificaron mediante un procedimiento multicromatográfico, las fracciones purificadas de *P. pastoris* X-33EntHF y *P. pastoris* X-33EntCRL35 no mostraron actividad antimicrobiana. Sin embargo, las fracciones purificadas de las levaduras recombinantes productoras de bacteriocinas híbridas sí que mostraron actividad antimicrobiana, sobre todo, en las fracciones purificadas resultantes de su elución por RP-FPLC (Tabla VII.5).

El aumento de actividad antimicrobiana durante la purificación de las bacteriocinas de los sobrenadantes de los cultivos productores, posiblemente se debe a la eliminación de inhibidores antimicrobianos, desagregación de las bacteriocinas o cambios en la conformación de las bacteriocinas inducidos por los solventes hidrófobos. Esto ya se ha observado durante la purificación de la garvicina ML, producida por *L. garvieae* DCC43 (Borrero et al., 2011). Igualmente, la actividad antimicrobiana recuperada del sobrenadante de *P. pastoris*, productor de EntP::EntHF, fue mayor que la del resto de levaduras recombinantes. No obstante, de interés es la reducción significativa de la actividad antimicrobiana de los eluatos de las fracciones purificadas por las diferentes columnas y geles cromatográficos (Tabla VII.5). Por ello, conviene realizar un mayor esfuerzo investigador en el diseño y empleo de nuevos procedimientos de purificación, que permitan una mejor y mayor recuperación de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas quimeras producidas por cepas recombinantes de *P. pastoris*.

La producción y purificación de las bacteriocinas EntHF y EntCRL35 fusionadas a la proteína hSUMO3 mediante el sistema de fusión de proteínas *Pichia* hSUMO-pro3<sup>®</sup>, se evaluó mediante inmuno dot-blot. Los sobrenadantes concentrados de las levaduras recombinantes que codificaban hSUMO3-EntHF y hSUMO3-EntCRL35, permitieron la detección de las proteínas de fusión a las 48 y 72 h de crecimiento de las cepas productoras, siendo la producción posiblemente mayor para hSUMO3-EntCRL35 que para hSUMO3-EntHF (Figura VII.2). Sin embargo, la liberación posterior de las bacteriocinas fusionadas mediante su escisión de la proteína de fusión hSUMO3 con la proteasa 2 y su posterior recuperación y concentración mediante cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC), no permitió la determinación de su actividad antimicrobiana cuando las fracciones se evaluaron mediante placas microtituladoras frente a *P. damnosus* CECT4797.

### **XI.5.3. Análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) y por monitorización de reacciones múltiples por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de ionización por electrospray [MRM-LC-ESI-MS/MS (QTRAP)], de las bacteriocinas purificadas**

Los análisis por MALDI-TOF MS de las fracciones purificadas procedentes del proceso multicromatográfico de purificación de las bacteriocinas de las levaduras recombinantes productoras y de digestión de las proteínas de fusión derivadas de hSUMO3, no permitieron determinar la presencia de las bacteriocinas clonadas por la determinación de su tamaño molecular esperado (resultados no mostrados). No obstante, los fragmentos peptídicos observados con una masa molecular distinta a la esperada podrían sugerir la presencia en las fracciones purificadas de bacteriocinas truncadas, interacción de las mismas con componentes biológicos desconocidos o que las bacteriocinas producidas hayan sufrido modificaciones postraduccionales como fosforilación, acetilación, metilación, oxidación, formilación, formación de puentes disulfuro o N- o O-glicosilación (Zhao and Jensen, 2009; Jiménez et al., 2013; Arbulu et al., 2015b).

Para tratar de determinar con mayor precisión si las bacteriocinas se encontraban en las fracciones purificadas, éstas se sometieron a un procedimiento de monitorización de reacciones múltiples (MRM) por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de ionización por electrospray [MRM-LC-ESI-MS/MS (QTRAP)], un método muy selectivo y sensible que permite la detección de péptidos a concentraciones de ng/mL o sub-ng/mL (Malmström et al., 2007; Yocum y Chinayian, 2009). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla VII.6. Las transiciones MRM se establecieron y validaron por espectrometría de masas en tándem (MALDI-TOF MS/MS). Para cada bacteriocina híbrida o bacteriocina quimera se detectó, al menos, la presencia de un péptido encriptado en su secuencia aminoacídica. Aunque no todos los péptidos identificados con esta metodología pudieron confirmarse por MALDI-TOF MS/MS, el método MRM sí que permitió identificar su presencia en la mayoría de las fracciones purificadas.

El método empleado permitió la identificación de 6 péptidos encriptados de la bacteriocina híbrida EntA::L::EntA confirmados por MALDI-TOF MS/MS (dotp 0,9) con al menos 5 transiciones, 3 de ellas consecutivas, y cubriendo el 68% de la secuencia de la EntA. La cobertura podría extenderse al 100% si consideramos secuencias repetidas de esta secuencia. Igualmente, para la bacteriocina híbrida EntA::L::EntHF el método MRM diseñado permitió la detección de dos péptidos que cubren el 39% de su secuencia. El péptido ATTCIAGMSIGGFLGGAIPGK se confirmó por MALDI-TOF MS/MS (dotp 0.79), mientras el péptido CGGGKYYGNGVSCNK, con mayor número de transiciones, no pudo confirmarse por MALDI-TOF MS/MS (tándem MS/MS). El método de MRM empleado también permitió la identificación de un 82% de la secuencia de la bacteriocina híbrida EntA::L::EntCRL35. En este caso, la técnica permitió la detección de 3 péptidos, 2 de ellos confirmados por tandem MS/MS (ATTCIAGMSIGGFLGGAIPGK; YYGNGVSCNK) y, el otro, confirmado por tandem MS/MS a partir de la librería peptídica previamente definida

(YYGNGVYCTK; CTVDWAK; ATTCIAGMSIGGFLGGAIPGK) (dotp > 0.8) (Tabla VII.6).

El método MRM diseñado para detectar la bacteriocina quimera EntA::EntHF en las fracciones purificadas, también confirmó la presencia de 4 péptidos encriptados en la secuencia de dicha bacteriocina por tandem MS/MS (dotp > 0.9), con al menos 5 transiciones, 3 de ellas consecutivas y cubriendo el 89,6% de su secuencia aminoacídica. En este caso, la cobertura podría extenderse al 100% de su secuencia aminoacídica considerando el péptido AIGIIGNNAAANLTTGGKAGWK, detectado por MRM pero que no pudo confirmarse mediante el programa informático MIDAS, posiblemente por la escasa calidad de los espectros.

De la bacteriocina quimera EntA::EntCRL35 también se detectaron 2 péptidos confirmados por tandem MS/MS (dotp 0,9) con 5 transiciones, 3 de ellas consecutivas y que cubren un 33% de su secuencia aminoacídica (Tabla VII.6). El péptido SYGNGVYCNNSK presente en las bacteriocinas quimeras EntP::EntHF y EntP::EntPCRL35 sólo pudo confirmarse por tandem MS/MS en la bacteriocina EntP::EntHF con 4 transiciones, 3 de ellas consecutivas (dotp 0,95). Ninguno de los otros péptidos encriptados e incluidos en el método MRM diseñado para ambas bacteriocinas pudo detectarse por tandem MS/MS, excepto el péptido CWVNWGK común para ambas bacteriocinas y el péptido AIGIIGNNAAANLTTGGK, presente sólo en la bacteriocina quimera EntP::EntHF y detectado con 3 transiciones consecutivas. El péptido AIGIIGNNSAANLATGGAAGWK encriptado en la secuencia aminoacídica de la quimera EntP::EntCRL35, no pudo ser detectado mediante el empleo de esta metodología (Tabla VII.6).

La metodología MRM también permitió la identificación de péptidos derivados de la fusión de las bacteriocinas EntHF y EntCRL35 a la proteína hSUMO3, obtenidas tras proteólisis de las proteínas de fusión y de su purificación por cromatografía IMAC (Tabla VII.6). Mediante la utilización de esta metodología fue posible la detección de 2 péptidos encriptados de la proteína hSUMO3, aunque solamente uno pudo ser confirmado por tandem MS/MS (dotp 0,95). La misma metodología permitió la identificación de fragmentos peptídicos encriptados de las bacteriocinas EntHF y EntCRL35 con, al menos 3 transiciones consecutivas, pero que no pudieron confirmarse por tandem MS/MS posiblemente debido a la escasa concentración y calidad de las bacteriocinas purificadas (Tabla VII.5). La tecnología de fusión hSUMO3 se ha propuesto como útil para la producción de proteínas difíciles de expresar ya que aumenta los rendimientos de producción, la expresión de proteínas, su solubilidad y plegamiento y facilita su purificación (Butt et al., 2005). Esta metodología se ha utilizado, sobre todo, para la expresión de proteínas por *E. coli* como hospedador heterólogo (Li et al., 2010; Zhang et al., 2014). No obstante, también se conoce que el péptido antimicrobiano NZ17074 se ha producido por *P. pastoris* recombinantes fusionado a la proteína de fusión SUMO (Wang et al., 2014). Sin embargo, de los resultados de este trabajo se deduce que puede ser necesario un mayor esfuerzo investigador para evaluar el comportamiento de la proteína de fusión SUMO, como una proteína lanzadera y de fusión para la producción y expresión funcional de bacteriocinas por *P. pastoris*.

#### **XI.5.4. Predicción de la estructura tridimensional (3D) de bacteriocinas híbridas y bacteriocinas quimeras mediante modelado por homología**

El modelado comparativo de proteínas utiliza estructuras resueltas previamente como puntos de partida o plantillas. La comparación es eficaz puesto que, a pesar de la enorme cantidad de proteínas existente, hay un conjunto limitado de motivos estructurales terciarios a los que la mayoría de las proteínas se adhieren. El modelado comparativo de proteínas utiliza dos métodos, de los que el modelado por homología se basa en la suposición razonable de que dos proteínas homólogas compartirán estructuras muy similares. Puesto que un plegado proteico está evolutivamente más conservado que su secuencia de aminoácidos, una secuencia objetivo puede ser modelada con una precisión razonable sobre una plantilla relacionada muy distante, siempre que la relación entre objetivo y plantilla sea perceptible en el alineamiento de sus secuencias.

La plataforma informatizada I-Tasser (Zhang, 2008; Roy et al., 2010; Yang et al., 2015) se ha empleado para predecir la estructura tridimensional (3D) de las bacteriocinas construídas, mientras el servidor PyMOL (DeLano, 2002) se ha empleado para la resolución figurada de las estructuras resultantes. Determinar la estructura 3D de las bacteriocinas diseñadas puede ayudar a comprender su actividad antimicrobiana y modo de acción y ayudar a un diseño más racional de las bacteriocinas construídas.

En este trabajo la estructura tridimensional (3D) obtenida de las bacteriocinas nativas EntHF y EntCRL35, así como de las bacteriocinas quimeras EntA::EntHF, EntA::EntCRL35, EntP::EntHF y EntP::EntCRL35 fué de buena calidad, con valores C de entre -1,13 y -0,29 (Figura VII.3). Los valores C suelen fluctuar de -5 a 2, donde los valores más altos sugieren modelos más fiables. Del modelado por homología de las bacteriocinas consideradas, se deduce que todas ellas muestran una región N-terminal en forma de lámina beta antiparalela y una región C-terminal en forma de hélice alfa con una región terminal más desestructurada, similar a las estructuras resueltas experimentalmente de otras bacteriocinas de la clase IIa. Sin embargo, las predicciones para las bacteriocinas híbridas mostraron estructuras más complejas, donde las dos bacteriocinas que componen la construcción se enredan creando impedimentos estéricos entre los aminoácidos, con valores C de entre -3,16 a -2,98 (Figura VII.3), lo que indica poca fiabilidad para estas estructuras, debido en parte, a la ausencia de estructuras similares resueltas experimentalmente y que, por lo tanto, no se encuentran en las bases de datos.

#### **XI.5.5. Comparación de la actividad antimicrobiana de la bacteriocina quimera EntP::EntHF sintética con la bacteriocina quimera EntP::EntHF recombinante, producida por *P. pastoris***

Cuando la actividad antimicrobiana de dichas bacteriocinas se comparó frente a *Listeria* spp. ambas bacteriocinas mostraron una elevada actividad antimicrobiana. No obstante, la bacteriocina quimera EntP::EntHF sintética mostró una actividad antimicrobiana específica de 1,1- a 11,3-veces mayor para 3 de las listerias evaluadas, mientras la bacteriocina quimera

recombinante fue más activa (de 503- a  $1,0 \times 10^5$ -veces mayor) frente a otras 3 listerias empleadas como microorganismos indicadores (Tabla VII.7). Por ello, parece que no solamente la estructura primaria sino también la estructura tridimensional (3D) de las bacteriocinas recombinantes, determina el reconocimiento óptimo por las bacteriocinas de receptores en las células sensibles. Igualmente se observa que, para algunas, no todas, las células sensibles se necesitarían concentraciones mayores del péptido sintético para alcanzar la misma actividad antimicrobiana que con las bacteriocinas recombinantes.

Diversas bacteriocinas sintéticas se han empleado para determinar su modo de acción y resistencia de las bacterias sensibles a su actividad (Fimland et al., 1996; Corbier et al., 2001; Ovchinnikov et al., 2014). Bacteriocinas quimeras sintéticas, derivadas de la pediocina PA-1 y la enterocina E-50-52, han mostrado una actividad antimicrobiana específica menor que la de sus análogos nativos (Tiwari et al., 2015). Sin embargo, parece conveniente la realización de más investigaciones que permitan una mayor y mejor evaluación de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas recombinantes, comparadas con la de sus análogos sintéticos.

Los resultados de este trabajo sugieren que la región N-terminal de la EntA y la EntP dirigen el procesamiento y secreción de bacteriocinas quimeras sintetizadas por levaduras recombinantes derivadas de *P. pastoris*, mientras su región C-terminal determina su actividad antimicrobiana (Tabla VII.5). No obstante, es conveniente el desarrollo de más estudios que determinen la influencia de determinados aminoácidos de la región N-terminal de estas bacteriocinas en la producción, procesamiento, secreción y expresión funcional de otras bacteriocinas quimeras. También se necesita un mayor esfuerzo investigador en el desarrollo de nuevos métodos de purificación o concentración de las bacteriocinas de los sobrenadantes de los cultivos productores. La producción heteróloga de cantidades más elevadas de bacteriocinas modificadas por técnicas de ingeniería genética y con una mayor actividad antimicrobiana y espectro de acción, constituyen un reto y una necesidad para una evaluación más completa de su potencial biotecnológico. El desarrollo de nuevos vectores de clonación y la evaluación de otros hospedadores procariotas y eucariotas que permitan una mayor producción de las bacteriocinas de interés se hacen necesarios para avanzar en la aplicación plausible de las bacteriocinas como conservadores naturales de los alimentos y como agentes terapéuticos de interés en medicina humana y veterinaria.

#### **XI.6. Clonación y expresión de genes sintéticos que codifican péptidos antimicrobianos (PAMs) nativos, péptidos híbridos y bacteriocinas-PAMs quimeras, por *Pichia pastoris***

##### ***Resumen***

En este trabajo se han diseñado genes sintéticos que codifican la secuencia aminoacídica madura de (a) los péptidos antimicrobianos (PAMs) microcina V (MccV), beta-defensina humana-3 (HBD-3), un péptido derivado de la catelicidina 2 (dCATH-2) y la pleurocidina de platija (PleWF), (b) de péptidos híbridos derivados de la fusión de la enterocina A (EntA)

madura a la MccV, HBD-3, dCATH-2 y PleWF mediante un péptido tri-Gly, y (c) de bacteriocinas-PAMs quimeras derivadas de la fusión de la región N-terminal de la EntA a la MccV, HBD-3, dCATH-2 y PleWF. Dichos genes sintéticos se clonaron en el vector de expresión proteica pPICZαA para su transformación en *P. pastoris*. Ninguna de las levaduras recombinantes, derivadas de *P. pastoris* X-33 y que codificaban los PAMs nativos y péptidos híbridos mostró actividad antimicrobiana directa y solamente *P. pastoris* X-33EntA::HBD-3, productor de la EntA::HBD-3, mostró actividad antimicrobiana directa mediante el test de estría en agar. Sin embargo, las fracciones purificadas de algunos de los sobrenadantes de las levaduras recombinantes que codificaban los PAMs nativos y de los sobrenadantes de las levaduras recombinantes que codificaban los péptidos híbridos sí que mostraron actividad antimicrobiana, siendo el sobrenadante purificado de *P. pastoris* X-33EntA::L::MccV, productor del péptido híbrido EntA::L::MccV, el de mayor actividad antimicrobiana. No obstante, los análisis por MALDI-TOF MS de las fracciones purificadas no revelaron la presencia en las muestras, de péptidos con la masa molecular deducida de los PAMs clonados. Los resultados de este estudio preliminar sugieren que la región N-terminal de la EntA dirige el procesamiento y secreción de péptidos híbridos antimicrobianos. Sin embargo, es necesario completar aquéllos experimentos que permitan determinar la influencia de la región terminal de la EntA en la producción, procesamiento, secreción y purificación a homogeneidad de las bacteriocinas-PAMs quimeras EntA::MccV, EntA::HBD-3, EntA::dCATH-2 y EntA::PleWF.

#### **XI.6.1. Clonación y expresión de péptidos antimicrobianos (PAMs) nativos, péptidos híbridos y bacteriocinas-PAMs quimeras, por *Pichia pastoris***

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) o péptidos de defensa del hospedador (PDH) constituyen un sistema de defensa natural antimicrobiano y son excelentes candidatos para el desarrollo de agentes antimicrobianos nuevos con un mayor espectro de acción o con espectros de acción ampliados (Bahar y Ren, 2013). Asimismo, los PAMs producidos por organismos multicelulares como hongos (Mygind et al., 2005) plantas (Tam et al., 2015) e insectos (Bulet and Stöcklin, 2005; Yi et al., 2014) así como las defensinas y catelicidinas (De Smet y Contreras, 2005) producidas por los vertebrados superiores, forman parte importante de la respuesta inmune innata. En los organismos unicelulares, los PAMs como las bacteriocinas son las responsables de competir con otras especies bacterianas (Duquesne et al., 2007; Drider and Rebuffat, 2011; Nes et al., 2014).

La producción de elevadas cantidades de PAMs por bacterias y células eucariotas sigue siendo crítica para su desarrollo científico e industrial. La pequeña cantidad de péptidos antimicrobianos que se obtiene de los productores naturales y el alto coste de la síntesis química a gran escala, hacen que su producción a partir de microorganismos recombinantes constituya una alternativa atractiva a su demanda (Borrero et al., 2012; Mao et al., 2015). La producción heteróloga de PAMs, como las bacteriocinas producidas por levaduras, ha mostrado ventajas con respecto a su producción por bacterias (Borrero et al., 2012), mientras el uso de genes sintéticos es de gran utilidad cuando las secuencias que codifican las proteínas de interés no se encuentran disponibles o son difíciles de obtener (Jiménez et al., 2014).



Además, la adaptación del codón de uso para la expresión de proteínas por levaduras favorecen su producción debido a una mayor eficacia de la traducción y el transporte de proteínas a través del retículo endoplásmico (Ward et al., 2011; Gao et al., 2012).

Por ello, en este trabajo se ha explorado el potencial de *P. pastoris* como productor de PAMs nativos, péptidos híbridos y bacteriocinas-PAMs quimeras con una potencial actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Además, se evaluó el potencial de la enterocina A (EntA) como péptido lanzadera para la producción y expresión de péptidos híbridos (Tabla VIII.1). En este estudio, también se ha procedido al diseño y clonación de genes sintéticos que codifican bacteriocinas-PAMs quimeras derivadas de la fusión de la región N-terminal de la EntA a la MccV, HBD-3, dCATH-2 y PleWF.

Para ello, los genes sintéticos que codifican los PAMs nativos (MccV, HBD-3, dCATH-2 y PleWF), péptidos híbridos (EntA::L::MccV, EntA::L::HBD-3, EntA::L::dCATH-2 y EntA::L::PleWF) y bacteriocinas-PAMs quimeras (EntA::MccV, EntA::HBD-3, EntA::dCATH-2 y EntA::PleWF) se clonaron en el plásmido pPICZαA y los vectores linearizados se transformaron en células competentes de *P. pastoris*, obteniéndose los correspondientes clones resistentes a zeocina. Las levaduras recombinantes que codificaban los PAMs nativos y péptidos híbridos no mostraron actividad antimicrobiana directa frente a *P. damnosus* CECT4797. Sólo *P. pastoris* X-33EntA::HBD-3, productor de la bacteriocina-PAM quimera EntA::HBD-3, mostró actividad antimicrobiana directa mediante la técnica de cultivo de las levaduras de estría en agar (Figura VIII.1).

La actividad antimicrobiana, potencialmente presente en los sobrenadantes de los cultivos de *P. pastoris* X-33 recombinantes que codificaban los PAMs nativos y péptidos híbridos, se purificó mediante un procedimiento multicromatográfico. Las fracciones resultantes de su última purificación por RP-FPLC mostraron actividad antimicrobiana, posiblemente debido a la eliminación de inhibidores antimicrobianos, desagregación de péptidos o cambios en la conformación de los péptidos inducidos por los solventes hidrófobos (Tabla VIII.4), como ya se ha observado en otras ocasiones (Borrero et al., 2011b; Arbulu et al., 2015, Arbulu et al., resultados no publicados). El sobrenadante purificado de *P. pastoris* X-33EntA::L::MccV, productor del péptido híbrido EntA::L::MccV, fue el de mayor actividad antimicrobiana. Sin embargo, es de interés observar que las fracciones purificadas de los sobrenadantes de otras levaduras recombinantes muestran una menor o muy variable actividad antimicrobiana durante su purificación, lo cual hace necesario evaluar procedimientos más eficaces de purificación de los péptidos nativos y péptidos híbridos producidos por levaduras recombinantes (Tabla VIII.4).

#### **XI.6.2. Análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) de los péptidos antimicrobianos (PAMs) y péptidos híbridos purificados**

Los análisis por MALDI-TOF MS de las fracciones purificadas de los sobrenadantes de las levaduras productoras de PAMs nativos y péptidos híbridos, mostraron la presencia de numerosos péptidos con masas moleculares distintas de las masas moleculares deducidas de

la secuencia aminoacídica de los PAMs clonados (Figura VIII.2). Las diferencias observadas pueden deberse a la presencia de péptidos truncados, interacción de los PAMs con compuestos desconocidos o componentes del medio de cultivo o, también, a modificaciones posttraduccionales de los péptidos sintetizados (Zhao y Jensen, 2009; Jiménez et al., 2013; Arbulu et al., 2015). También es posible que cantidades muy pequeñas de los péptidos clonados hagan difícil su detección e identificación por MALDI-TOF MS (Arbulu et al., resultados no publicados).

Como se ha comentado en otras secciones de esta memoria, el vector de expresión pPICZ $\alpha$ A con un promotor fuerte e inducible y la señal de procesamiento Kex2 y, en concreto la posición Kex2 P1' parecen jugar un papel relevante en la secreción de proteínas por *P. pastoris* (Yang et al., 2013; Jiménez et al., 2013). En este trabajo, la posición Kex2 P1' para MccV, HBD-3, dCATH-2 y PleWF fueron los aminoácidos A, G, R y G, respectivamente, mientras que para la EntA, producida satisfactoriamente por *P. pastoris*, posee el aminoácido T en la posición Kex2 P1' (Tabla VIII.1). Por ello, debería realizarse un mayor esfuerzo investigador en la caracterización de aquéllos aminoácidos en la región N-terminal de bacteriocinas, PAMs y péptidos híbridos con mayor influencia en el procesamiento y secreción de péptidos y proteínas por *P. pastoris*. Aunque diversos PAMs han sido producidos por *P. pastoris* (Chen et al., 2011; Peng et al., 2014; Zhang et al., 2015), su producción es siempre variable y dependiente de numerosos factores, todavía sin evaluar adecuadamente (Burrowes et al., 2005; Love et al., 2012; Borrero et al., 2012; Yang et al., 2013).

Los resultados de este estudio preliminar sugieren que la región N-terminal de la EntA puede dirigir el procesamiento y secreción de péptidos híbridos (Tabla VIII.4). Sin embargo, es necesario identificar su presencia en las fracciones purificadas mediante su análisis por MRM-ESI-LC/MS/MS (QTRAP) (Arbulu et al., resultados no publicados). Igualmente es necesario evaluar la producción y actividad antimicrobiana de las bacteriocinas-PAMs quimeras EntA::MccV, EntA::HBD-3, EntA::dCATH-2 y EntA::PleWF producidas por las levaduras recombinantes construídas pero todavía no, adecuadamente, evaluadas. Los péptidos híbridos y las bacteriocinas-PAMs quimeras construídas mediante las técnicas genéticas descritas en este trabajo deben evaluarse con mayor profundidad porque su producción en mayores cantidades y la mejora de su actividad antimicrobiana y espectro de acción constituyen un reto científico y una necesidad que deben complementarse con el diseño y puesta a punto de métodos mejorados de concentración o purificación de proteínas.

#### **XI.7. Determinación de la secuencia genómica de la cepa bacteriocinogénica de *Enterococcus faecalis* DBH18, aislada de ánades reales (*Anas platyrhynchos*)**

##### **Resumen**

En este trabajo se ha determinado la secuencia genómica de *Enterococcus faecalis* DBH18, una cepa bacteriocinogénica aislada de ánades reales (*Anas platyrhynchos*). El ensamblaje de

las secuencias obtenidas originó 2,836,724 pb con un contenido G+C del 37.6%. El genoma posee 2,654 secuencias de ADN codificantes (CDS) y 50 de ARNs.

*Enterococcus faecalis* DBH18, aislado de ánades reales (*Anas platyrhynchos*) (Sánchez et al., 2007), se caracteriza por una elevada actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas incluidas *Listeria* spp. y codifica los genes productores de las bacteriocinas enterocina V583 (*efl097*) y enterocina JS (*entJSA-entJSB*) (GenBank, número de acceso EF502034). Además, *E. faecalis* DBH18 produce gelatinasa (GelE) una metaloproteínasa responsable de la producción de péptidos bioactivos con actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina (AI-ECA), actividad antihipertensiva y antioxidante durante su desarrollo en leche desnatada de vaca (Gútiérrez et al., 2013; Gutiérrez et al., 2014).

El ADN genómico purificado de *E. faecalis* DBH18 se secuenció mediante la plataforma de secuenciación masiva Illumina MiSeq. La secuencia-borrador del genoma de *E. faecalis* DBH18 estaba formada por 32 marcos (en inglés, *contigs*) con un total de 2.836.724 pb y un contenido de G+C del 37,6%. El marco más extenso fue de 382.771 pb y el más corto de 241 pb. El número de secuencias de ADN codificantes fue de 2.654 y el número de secuencias codificantes de ARNs de 50. El análisis *in silico* de las secuencias resultantes mediante el software BAGEL3 (van Heel et al., 2013), confirmó la presencia de los genes estructurales y adyacentes de la enterocina JS (EntJSA-EntJSB). La presencia de genes que codifican la enterocina V583 (EntV583), gelatinasa (GelE) y serina proteasa (SprE), se determinó separadamente. No se identificó la presencia de genes que codifican resistencias a antibióticos ni de los genes que codifican los factores de virulencia *cylLMAB* (precursores de la citolisina y de su maduración, procesamiento y secreción), *ace* (adhesión al colágeno) y *esp* (proteína de superficie de enterococos). Tampoco se han encontrado repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas de nucleótidos (CRISPR, del inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) (Grissa et al., 2007). La cepa de *E. faecalis* DBH18 se ha depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España) como *E. faecalis* CECT8935.

La determinación de la secuencia genómica de *E. faecalis* DBH18 facilitará la realización de estudios acerca de la síntesis, procesamiento y secreción de bacteriocinas sin secuencia líder ni péptido señal como la EntJS (EntJSA-EntJSB) y refuerza su posible uso como productor de péptidos bioactivos durante su desarrollo en leche de diversas especies animales o en otros sustratos proteicos de origen alimentario.

#### **XI.8. Efecto de hidrolizados lácteos fermentados y de péptidos antihipertensivos sintéticos en la microbiota fecal humana y composición de ácidos grasos de cadena corta (SCFA)**

##### **Resumen**

En este trabajo se evaluó (a), el efecto de hidrolizados lácteos con actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina (AI-ECA) obtenidos tras el desarrollo de *E. faecalis*

DBH18 en leche desnatada de vaca (BSMH, del inglés *bovine skim milk hydrolysate*), (b) de su fracción filtrada (BSMF, del inglés *bovine skim milk filtered*), y (c) de los péptidos sintéticos antihipertensivos LHLPLP y HLPLP en la microbiota fecal humana y composición de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs, del inglés *short chain fatty acids*). La composición filogenética de la microbiota fecal humana se determinó por amplificación y secuenciación de genes 16S rRNA mediante la plataforma de secuenciación masiva Illumina MiSeq. Tras la adición de hidrolizados lácteos y péptidos sintéticos (BSMH, BSMF, LHLPLP y HLPLP) la estructura de la microbiota fecal humana permaneció estable con Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria como los filos prevalentes. Sin embargo, a niveles taxonómicos inferiores pudieron observarse algunas diferencias. La familia Enterococcaceae y miembros de los géneros *Bifidobacterium* y *Blautia* aumentaron mientras el género *Oscillospira* disminuyó tras los tratamientos con BSMH y BSMF, pero no con los péptidos sintéticos LHLPLP y HLPLP. Las diferencias observadas en la composición de la microbiota fecal humana fueron siempre mayores con BSMH que con BSMF. También se han observado modificaciones en la composición de SCFAs, tras la adición a las heces de hidrolizados lácteos fermentados y péptidos sintéticos antihipertensivos. Las concentraciones de propionato y butirato fueron mayores tras la adición de BSMH que con BSMF y los péptidos sintéticos. Sin embargo, la producción de propionato y butirato tras el tratamiento de las heces con LHLPLP y HLPLP resultó próxima a la de las heces control. Por otro lado, los ratios molares de producción de acetato:propionato:butirato se mostraron ligeramente diferentes en las muestras con BSMH y BSMF que en aquellas con los péptidos sintéticos. Pese a las limitaciones por el número de muestras analizadas parece que el impacto en la composición de la microbiota fecal humana y la producción de SCFAs, fue mayor tras la adición de los hidrolizados lácteos BSMH y BSMF que con los péptidos sintéticos LHLPLP, HLPLP, que se comportaron de forma similar a las muestras de heces utilizadas como controles. Por ello, sería recomendable que todos aquellos hidrolizados fermentados de origen alimentario que contengan péptidos bioactivos de interés en alimentación humana se evaluaran por su efecto en la microbiota fecal humana y composición de SCFAs y, mejor aún y de ser posible, en animales de experimentación y en la microbiota intestinal humana.

### **XI.8.1. Análisis de amplicones que codifican el 16S rRNA y composición de la microbiota fecal humana**

De gran interés científico y aplicado es conocer el efecto en la microbiota humana de hidrolizados alimentarios, enriquecidos en péptidos bioactivos con efectos beneficiosos en la salud humana una vez liberados por enzimas digestivos, fermentación o hidrólisis con enzimas proteolíticas específicas o preparaciones enzimáticas de grado alimentario. De interés es también conocer el efecto en la microbiota humana de péptidos sintéticos biológicamente activos. La microbiota humana generalmente se caracteriza mediante el análisis de la microbiota fecal que, aunque no refleja la diversidad total de la microbiota del tracto gastrointestinal (TGI) es de momento, la mejor opción hasta que nuevas tecnologías permitan una mejor y más segura recogida de las muestras para análisis.

La composición filogenética de la microbiota de las muestras fecales humanas se determinó por amplificación y secuenciación de genes que codifican 16S rRNA, mediante el empleo de la plataforma de secuenciación masiva Illumina MiSeq. Para ello, se analizaron 96 muestras fecales humanas incluyendo los controles. Los resultados de la secuenciación se procesaron con la plataforma QIIME que categoriza y agrupa secuencias que comparten un nivel mínimo de similitud en unidades operacionales taxonómicas (OTU, del inglés *operational taxonomic unit*), permitiendo su asignación a distintos grupos taxonómicos.

De los resultados de este trabajo se deduce que la estructura de la microbiota fecal humana permanece estable tras la adición de hidrolizados lácteos fermentados derivados de leche de vaca y de péptidos antihipertensivos sintéticos, apoyando la idea de que la comunidad microbiana se mantiene estable entre individuos (Lozupone et al., 2012; Donaldson et al., 2016). Los filos microbianos dominantes en las muestras de heces humanas fueron Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria con valores medios de identificación del 51,6%, 33,0%, 14,4%, respectivamente, independientemente de la muestra fecal analizada o del tiempo de tratamiento de las muestras. Estos resultados concuerdan con estudios previos sobre el TGI humano y su microbiota más representativa (Ley et al., 2006; Sekirov et al., 2010). La familia Bacteroidaceae fue la más prevalente entre los Bacteroidetes (valores medios del 29,0%) mientras las familias Ruminococcaceae y Lachnospiraceae fueron las más frecuentes entre los Firmicutes con valores medios de 21.3% y 16.5%, respectivamente. Las comparaciones a nivel de género, entre las 0 y 24 h de evaluación de las muestras fecales, revelaron que el género *Parabacteroides* aumentó del 0,5% a 1,4%, el género *Blautia* del 1,5% al 7,8% y el género *Oscillospira* del 2,3% al 10,1%, mientras la presencia de otros géneros como *Lachnospira* o *Ruminococcus* disminuyó en las muestras evaluadas (Figura X.2A, 2B).

La presencia de microorganismos del género *Blautia* fue mayor en las muestras fecales con hidrolizados lácteos que con los péptidos sintéticos y en las muestras control (BSMH, 8.5%; BSMF, 6.6%; LHLPLP-, HLPLP- y control  $\leq 1\%$ ). Los microorganismos del género *Blautia* (familia Lachnospiraceae) son importantes para la asimilación de nutrientes y están involucrados en la degradación de polisacáridos complejos a SCFAs incluyendo acetato, propionato y butirato, que el hospedador puede usar como fuente de energía. Además, los oligotipos del género *Blautia* son específicos de hospedador y pueden servir como marcadores universales de contaminación fecal (Eren et al., 2015).

En este contexto se conoce que *E. faecalis* DBH18 muestra actividad antimicrobiana al desarrollarse en medios de cultivo complejos (Sánchez et al., 2007), pero también en leche desnatada de vaca (Gútiez et al., 2013), posiblemente debido a la producción de las bacteriocinas enterocina V583 (EntV583) y enterocina JS (EntJSA-EntJSB) (Arbulu et al., en prensa). Sin embargo, además de las bacteriocinas producidas por *E. faecalis* DBH18 otros componentes lácteos y/o péptidos antimicrobianos encriptados en la secuencia de las caseínas y/o oligosacáridos presentes en los hidrolizados lácteos BSMH y BSMF, podrían ser responsables de los cambios observados en la microbiota fecal. La producción de bacteriocinas y su actividad antimicrobiana es un rasgo probiótico deseable (Dobson et al.,

2012). No obstante, todavía hay pocos estudios sobre el efecto de las bacteriocinas en la microbiota del TGI de animales vivos (Riboulet-Bisson et al., 2012; Kwok et al., 2015; Yang et al., 2015).

La presencia de la familia Enterococaceae y de bacterias del género *Bifidobacterium* fue mayor en las muestras con los hidrolizados lácteos BSMH y BSMF que en las tratadas con los péptidos sintéticos y las muestras control (sin hidrolizados lácteos ni péptidos sintéticos antihipertensivos). En este sentido, la actividad antimicrobiana de *Bifidobacterium* spp. podría modular el crecimiento de determinados grupos bacterianos. El género *Bifidobacterium* se ha involucrado en la prevención de diarreas, el establecimiento de una microbiota saludable, intolerancia a la lactosa y la respuesta inmune inflamatoria, por lo que su mayor presencia en las heces humanas podría ser beneficiosa (Lee y O'Sullivan, 2010; Turroni et al., 2011).

Por otra parte, el género *Oscillospira* se identificó menos frecuentemente en las muestras tratadas con BSMH y BSMF (3.4% y 4.2%, respectivamente) que con los péptidos sintéticos ( $\approx 10\%$ ) (Figura X.2B). En gemelos monocigóticos se ha observado que una reducción del índice de masa corporal se asocia a una menor proporción de microorganismos del género *Oscillospira* (Tims et al., 2013). En general, las muestras fecales humanas con LHLPLP o HLPLP mostraron una composición microbiana similar a las muestras fecales controles, que no contienen hidrolizados lácteos ni péptidos sintéticos.

En general, las pequeñas modificaciones observadas en la microbiota fecal humana fueron más evidentes tras la adición de los hidrolizados lácteos fermentados BSMH y BSMF, derivados de leche de vaca, que tras la adición de los péptidos sintéticos LHLPLP y HLPLP. Además, las modificaciones inducidas por BSMH fueron, generalmente, mayores que las inducidas por BSMF.

### **XI.8.2. Diversidad de la microbiota fecal humana**

La diversidad de la microbiota fecal humana disminuyó con el tiempo de tratamiento de las muestras (Figura X.3) y no se observó un mayor agrupamiento de OTUs en relación con el tiempo de tratamiento o con las muestras evaluadas (Figura X.4). La alfa-diversidad de la microbiota de las muestras fecales humanas se evaluó mediante cálculos determinados por QIIME que permitieron construir las curvas de rarefacción (Figura X.3), en las que el número de secuencias se enfrenta al número de especies. La riqueza de especies disminuyó con el tiempo (Figura X.3A) y este descenso fue menor en las muestras con hidrolizados lácteos que con los péptidos sintéticos, que se comportaron de manera similar a los controles (Figura X.3B). Los datos de beta-diversidad, basados en la distancia de Bray-Curtis se solaparon sin distinción entre los parámetros tiempo y tratamiento, y se mostraron agrupados en función de la muestra fecal (Figura X.4).

### **XI.8.3. Composición de ácidos grasos de las muestras fecales humanas**

La composición de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) de las muestras fecales humanas con hidrolizados lácteos fermentados (BSMH y BSMF) y con los péptidos antihipertensivos sintéticos (LHLPLP y HLPLP), se determinó por cromatografía de gases (GC). Los niveles de SCFAs variaron a lo largo del tiempo en las muestras tratadas con los hidrolizados lácteos fermentados y con los péptidos sintéticos (Tabla X.1). Las mayores concentraciones de SCFAs fueron para el ácido acético, seguido del ácido butírico, ácido valérico y ácido propiónico. En el tiempo 0 h del ensayo solamente se detectó el ácido acético mientras el resto de los SCFAs fue aumentando con el tiempo. Las concentraciones más elevadas de SCFAs se alcanzaron a las 24 h de tratamiento de las muestras con BSMH y con concentraciones de 562,8-, 45,7-, 127,3-, 10,0- y 103,7 mM/kg de heces para el ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido isovalérico y ácido valérico, respectivamente.

Tras la adición a las heces de BSMH la concentración de SCFAs aumentó de 1,6 a 3,6 veces, en comparación con las muestras control (Tabla X.1). Cuando las muestras se trataron con BSMF solo el ácido acético incrementó su concentración (2,8 veces, con respecto al control), mientras la concentración del resto de SCFAs permaneció a concentraciones más bajas que las muestras control (de 1,1 a 2,1, veces menor). Las cantidades de acetato, propionato y butirato en las heces con LHLPLP y HLPLP fueron similares a aquéllas en las muestras control. Sin embargo, es interesante destacar que las concentraciones de ácido isovalérico en las muestras tratadas con LHLPLP y HLPLP fueron de 2,4- a 2,5-veces mayores que en las muestras control, mientras las concentraciones de ácido valérico fueron menores para las muestras con LHLPLP (1,4 veces menor) que con HLPLP (2,6 veces menor), comparadas con las determinadas en las muestras control (Tabla X.1).

Los ratios molares acetato:propionato:butirato también fueron cambiando durante el tiempo del ensayo, con una reducción en el porcentaje de acetato en favor de concentraciones crecientes de propionato y butirato (Tabla X.1). Como se ha citado previamente, en el tiempo 0 h del ensayo solo se detectó acetato con la ratio acetato:propionato:butirato de 100:00:00, aunque las cantidades de propionato y butirato se incrementaron posteriormente. A las 24 h del ensayo, en las muestras con BSMH y BSMF las ratios acetato:propionato:butirato fueron de 76:06:17 y 88:04:08, respectivamente. En las muestras con LHLPLP y HLPLP también se observó un incremento en la cantidad de propionato y butirato con una ratio de acetato:propionato:butirato de 68:09:24 y 69:08:22, respectivamente, muy similares a las de las muestras control (66:10:24).

La fermentación de carbohidratos en una actividad de suma importancia realizada por la microbiota del TGI (Marchesi et al., 2016). En condiciones de anaerobiosis los carbohidratos no digeridos son fermentados a SCFAs como aceptores finales de electrones y fuente de energía para el hospedador. Otras funciones atribuidas a los SCFAs son las inmunomoduladoras, resolución de procesos inflamatorios, cambios en la motilidad, saciedad e ingesta de alimentos, inhibición del desarrollo de patógenos y efectos anticancerígenos (Flint et al., 2012). El filo Bacteroidetes produce principalmente acetato y propionato

mientras que el filo Firmicutes produce butirato. El acetato parece regular la síntesis de colesterol y la deposición de tejido adiposo, mientras el propionato disminuye la concentración de colesterol en sangre e inhibe la síntesis de ácidos grasos. Igualmente, el ácido butírico reduce el riesgo de cáncer de colon regulando el desarrollo y diferenciación celular (Robles-Alonso and Guarner, 2012; den Besten et al., 2013). Se ha descrito que modificaciones en la concentración de SCFAs pueden deberse a cambios en la microbiota (Tanaka et al., 2016). Por ello, las modificaciones observadas en las cantidades de SCFAs inducidas, sobre todo, por la presencia de los hidrolizados lácteos fermentados BSMH y BSMF en las muestras de heces humanas, seguramente son un reflejo de las modificaciones observadas en la estructura y composición de la microbiota de las heces.

Hasta dónde nosotros podemos conocer puede ser que éste sea el primer estudio que evalúa la influencia de hidrolizados lácteos fermentados con actividad inhibidora de la ECA (AI-ECA) y actividad antihipertensiva, en la microbiota fecal humana. Pese a limitaciones en el número de muestras evaluadas, el impacto de la adición de hidrolizados lácteos fermentados en la microbiota fecal y composición de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) parece ser mayor con el hidrolizado BSMH que con el BSMF, posiblemente por la presencia en el primero de nutrientes, oligosacáridos y péptidos con actividad antimicrobiana no eliminados por filtración. Sin embargo, la adición a las muestras de heces de los péptidos sintéticos LHLPLP y HLPLP, indican que su efecto en la microbiota y composición de SCFAs es similar al observado en las muestras control.





**CAPÍTULO**  
***CHAPTER***

**XII**

**CONCLUSIONES**

***CONCLUSIONS***



**PRIMERA.** De la evaluación de bacterias lácticas (BAL) aisladas de heces de buitres leonados (*Gyps fulvus* subesp. *fulvus*) por su actividad antimicrobiana, genes que codifican bacteriocinas, factores potenciales de virulencia, susceptibilidad a antibióticos y genotipado por las técnicas de ERIC-PCR y MLST, así como por la caracterización bioquímica de las bacteriocinas purificadas por MALDI-TOF MS, secuenciación aminoacídica N-terminal por degradación de Edman y secuenciación *de novo* de las bacteriocinas purificadas por MALDI TOF/TOF MS, se ha determinado que el 36% de las BAL evaluadas mostraron actividad antimicrobiana siendo los enterococos el grupo mayoritario (91%) y *E. faecium* (40%), la especie más antagonista. De especial interés ha sido el aislamiento y caracterización de *E. faecium* M3K31, productor de la EntHF de elevada actividad antimicrobiana frente a *Listeria* spp. y que cumple requerimientos establecidos para su uso como probiótico en producción animal. La cepa de *E. faecalis* M3M42 también se postula como una cepa segura para la producción de péptidos bioactivos.

**SEGUNDA.** La clonación y expresión de genes sintéticos que codifican las bacteriocinas de amplio espectro de acción SRCAM 602, OR-7, E-760 y L-1077, previamente caracterizadas por su actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas incluyendo *Campylobacter* spp. y producidas por levaduras recombinantes, derivadas de *P. pastoris*, ha permitido determinar que ninguna de las levaduras recombinantes mostraron una actividad antimicrobiana directa y que la potencialmente presente en los sobrenadantes de los cultivos productores, solo pudo evaluarse mediante un procedimiento multicromatográfico de purificación. Sin embargo, el análisis de las fracciones purificadas por MALDI-TOF MS y MALDI TOF/TOF, reveló la presencia en las mismas de fragmentos peptídicos no relacionados con la masa molecular deducida de las bacteriocinas clonadas.

**TERCERA.** La utilización de técnicas de dicroísmo circular (CD) y de resonancia magnética nuclear (NMR) han permitido determinar la estructura tridimensional (3D) de la EntHF, producida por *E. faecium* M3K31. Los resultados obtenidos sugieren que la bacteriocina adopta la forma de lámina beta antiparalela en su región N-terminal, seguida de una hélice alfa bien definida en la región central y de una región C-terminal más desestructurada. Todo ello sugiere que la EntHF posee tres dominios estructurales diferenciados que podrían actuar de manera coordinada y que su estructura (3D) en solución se ajusta al conocimiento existente acerca del reconocimiento de receptores específicos y modo de acción de bacteriocinas de la clase IIa.

**CUARTA.** La utilización de técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) y de la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq han permitido la secuenciación del genoma de *E. faecium* M3K31, productor de la EntHF. El ensamblaje de las secuencias obtenidas produjo un total de 2.722.557 pb, con un contenido de G+C del 38.1%. El análisis de las secuencias resultantes confirmó que *E. faecium* M3K31 codifica la EntHF, enterocina P (EntP) y un péptido 85% idéntico a la bacteriocina SRCAM 602, la ausencia de genes requeridos para su consideración como un probiótico seguro en alimentación animal y una repetición palindrómica corta agrupada y regularmente interespaciada de nucleótidos (CRISPR).

**QUINTA.** De la clonación de genes sintéticos diseñados de (a), las bacteriocinas EntHF y EntCRL35, (b) de bacteriocinas híbridas derivadas de la fusión de la EntA consigo misma, con la EntHF y con la EntCRL35, y (c) de bacteriocinas quimeras derivadas de la fusión de la región N-terminal de la EntA y la EntP con la región C-terminal de la EntHF y la EntCRL35, así como de la fusión de EntHF y EntCRL35 a la proteína hSUMO3, se ha determinado que solamente las levaduras recombinantes que expresan bacteriocinas quimeras pero no las bacteriocinas híbridas y bacteriocinas fusionadas a la proteína hSUMO3, mostraron actividad antimicrobiana en sus sobrenadantes. Los análisis por MALDI-TOF MS no permitieron detectar las bacteriocinas en las fracciones resultantes de los sobrenadantes purificados pero los análisis por MRM-ESI-LC-MS/MS (QTRAP) sí que lo permitieron. Los resultados obtenidos sugieren que EntA y EntP dirigen el procesamiento y secreción de bacteriocinas híbridas y de bacteriocinas quimeras producidas por *P. pastoris*. Además, la actividad antimicrobiana específica de la quimera recombinante EntP::EntHF fué mayor que la de la EntP::EntHF sintética, frente a diversas *Listeria* spp. incluyendo *L. monocytogenes*. No obstante, la producción recombinante de bacteriocinas quimeras parece menor de lo esperado y su purificación a homogeneidad otro de los aspectos a optimizar y mejorar.

**SEXTA.** De la clonación de genes sintéticos que codifican los (a), péptidos antimicrobianos (PAMs) microcina V (MccV), beta-defensina humana-3 (HBD-3), catelicidina 2 (dCATH-2) y pleurocidina (PleWF), (b) de péptidos híbridos derivados de la fusión de la enterocina A (EntA) a la MccV, HBD-3, dCATH-2 y PleWF, y (c) de bacteriocinas-PAMs quimeras derivadas de la fusión de la región N-terminal de la EntA a la MccV, HBD-3, dCATH-2 y PleWF, se ha determinado que los resultados de este estudio preliminar sugieren que la EntA dirige el procesamiento y secreción de péptidos híbridos antimicrobianos y de las bacteriocinas-PAMs quimeras, por *P. pastoris*. Sin embargo, todavía es necesario completar experimentos que permitan determinar la influencia de la región N-terminal de la EntA en la producción y purificación de las bacteriocinas-PAMs quimeras EntA::MccV, EntA::HBD-3, EntA::dCATH-2 y EntA::PleWF.

**SÉPTIMA.** La utilización de técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) y de la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq también han permitido la secuenciación del genoma de *E. faecalis* DBH18, una cepa bacteriocinogénica aislada de ánades reales (*Anas platyrhynchos*). El ensamblaje de las secuencias obtenidas originó 2.836.724 pb con un contenido de G+C del 37.6%. El análisis de las secuencias resultantes confirmó la presencia de genes que codifican la enterocina JS (EntJSA-EntJSB), gelatinasa (GelE) y serina proteasa (SprE) pero no la presencia de genes que codifican factores potenciales importantes de virulencia. Todo ello, facilitará la realización de estudios acerca de la producción de bacteriocinas como la EntJS sintetizada sin una extensión N-terminal y refuerza el uso de *E. faecalis* DBH18 como un productor seguro de péptidos bioactivos.

**OCTAVA.** La utilización de técnicas de amplificación y secuenciación de genes que codifican 16S rRNAs y la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq, han permitido evaluar el efecto de hidrolizados lácteos fermentados, derivados del desarrollo de *E. faecalis* DBH18 en leche desnatada de vaca (BSMH y BSMF) y de péptidos sintéticos

antihipertensivos (LHLPLP y HLPLP), en la microbiota fecal humana y en su composición de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs). Pese a las limitaciones por el número de muestras analizadas, parece que el impacto en la composición de la microbiota fecal humana y la producción de SCFAs fue mayor tras la adición de los hidrolizados lácteos BSMH y BSMF que con los péptidos sintéticos LHLPLP y HLPLP. Por ello, sería recomendable que hidrolizados fermentados conteniendo péptidos bioactivos de interés en alimentación humana se evaluaran por su efecto en la microbiota fecal humana y composición de SCFAs y, mejor aún y de ser posible, en animales de experimentación y en la microbiota intestinal humana.

**FIRST.** From the evaluation of lactic acid bacteria (LAB), isolated from Griffon vulture feces (*Gyps fulvus* subesp. *fulvus*) for their antimicrobial activity, genes coding bacteriocins, potential virulence factors, antibiotic susceptibility and genotyping by ERIC-PCR and MLST as well as from the biochemical characterization of purified bacteriocins by MALDI-TOF MS, N-terminal sequencing by Edman degradation and *de novo* sequencing by MALDI TOF/TOF MS, it has been determined that 36% of the evaluated LAB showed antimicrobial activity, being enterococci the most prevalent group (91%) and *E. faecium* (40%), the most antagonistic species. Of special interest has been the isolation and characterization of *E. faecium* M3K31, producer of EntHF with elevated antimicrobial activity against *Listeria* spp. and with the requirements for its use as a safe probiotic in animal nutrition. The strain of *E. faecalis* M3M42 is also proposed as a safe strain for production of bioactive peptides.

**SECOND.** Synthetic genes encoding the broad antimicrobial spectrum bacteriocins SRCAM 602, OR-7, E-760 and L-1077, previously described for their antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria including *Campylobacter* spp. were cloned in vector pPICZ $\alpha$ A, for expression by *P. pastoris*. However, none of the recombinant yeasts showed direct antimicrobial activity and the antimicrobial activity of the purified supernatants could only be evaluated by a multichromatographic purification procedure. Furthermore, analysis of the purified fractions by MALDI-TOF MS and MALFI TOF/TOF revealed the presence in the samples of peptide fragments, not related to the deduced molecular mass of the cloned bacteriocins.

**THIRD.** The use of circular dichroism (CD) and nuclear magnetic resonance (NMR) techniques has permitted the evaluation of the three dimensional (3D) structure of the EntHF, produced by *E. faecium* M3K31. The results obtained suggest that the bacteriocin adopts an antiparallel beta-sheet structure in the N-terminal region, followed by a well-defined central alpha-helix and a more disorganized C-terminal end. These three different domains could act in a coordinated manner while the 3D structure recorded for EntHF fits emerging facts regarding target recognition and mode of action of class IIa bacteriocins.

**FOURTH.** The use of next generation sequencing techniques (NGS) and the Illumina MiSeq sequencing platform has permitted determination of the draft genome of *E. faecium* M3K31. The assembly of the sequences produced a total of 2,722,557 bp, with a G+C content of 38.1%. *In silico* analysis of the resulting sequences confirmed that *E. faecium* M3K31 encodes the EntHF structural gene, the EntP structural and immunity genes and the structural gene encoding a peptide 85% identical to bacteriocin SRCAM 602. The absence in the genome of a number of virulence-associated factors potentiates the recognition of this strain as a safe feed additive. The presence of a clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) array, considered a barrier to foreign DNA uptake was also detected in this strain.

**FIFTH.** Synthetic genes designed from (a), native bacteriocins EntHF and EntCRL35, (b) hybrid bacteriocins derived from the fusion of mature EntA to itself, to EntHF and to EntCRL35, and (c) from bacteriocin-derived chimeras derived from fusion of the N-terminal

region of EntA and EntP to the C-terminal region of EntHF and EntCRL35, were cloned in pPICZαA for expression by *P. pastoris*. The expression vector pP-αhSUMO3 was also used to clone *entHF* and *entCRL35* to the hSUMO3 fusion protein. MALDI-TOF MS analysis of purified supernatant fractions from yeasts producers of native, hybrid, bacteriocin-derived chimeras and hSUMO3-fused bacteriocins did not reveal the presence in the samples of peptides with the expected molecular mass of the bacteriocins being evaluated. However, MRS-ESI-LC-MS/MS (QTRAP) analysis revealed the presence of the expected bacteriocins in the purified fractions. The results obtained suggest that EntA and EntP could drive the processing and secretion of hybrid and bacteriocin-derived chimeras produced by *P. pastoris*. Besides, the specific antimicrobial activity of the recombinant EntP::EntHF was larger than that of the chemically synthesized peptide against different *Listeria* spp. including *L. monocytogenes*. However, the production of recombinant bacteriocin-derived chimeras seems to be lower than expected and their purification to homogeneity the subject of further refinements.

**SIXTH.** Synthetic genes designed from (a) the antimicrobial peptides (AMPs) microcin V (MccV), human beta-defensin 3 (HBD-3), cathelicidin 2 (dCATH-2) and pleurocidin (PleWF), (b) hybrid peptides derived from the fusion of EntA to MccV, HBD-3, dCATH-2 and PleWF, and (c) bacteriocin-AMPs chimeras derived from fusion of the N-terminal region of EntA to MccV, HBD-3, dCATH-2 and PleWF, were cloned in pPICZαA for expression by *P. pastoris*. Preliminary results suggest that EntA drives the processing and secretion of hybrid peptides and the bacteriocin-AMPs-derived chimeras by *P. pastoris*. However, more experiments need to be completed to ascertain the influence of the N-terminal region of EntA in the production and further purification of the bacteriocin-AMPs-derived chimeras EntA::MccV, EntA::HBD-3, EntA::dCATH-2 and EntA::PleWF.

**SEVENTH.** The draft genome sequence of *E. faecalis* DBH18, a bacteriocinogenic strain isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*), is also reported. The assembly of the sequences produced a total of 2,836,724 bp, with a G+C content of 37.6%. The analysis of the resulting sequences confirmed the presence of genes encoding enterocin JS (EntJSA-EntJSB), gelatinase (GelE) and serine protease (SprE), and the absence of genes encoding antibiotic resistances and potential virulence factors. These results would promote efforts towards elucidation of the synthesis of bacteriocins such as the EntJS without a N-terminal extension and strengthen the usefulness of *E. faecalis* DBH18 as a safe producer of bioactive peptides.

**EIGHT.** The use of 16S rRNA gene sequencing and the Illumina MiSeq platform were used to evaluate the effect of milk fermented hydrolysates, derived from growth of *E. faecalis* DBH18 in bovine skim milk (BSMH and BSMF) and the use of chemically synthesized peptides (LHLPLP and HLPLP), for their effect on the human fecal microbiota and composition of short chain fatty acids (SCFAs). Despite limitations in the number of analysed samples it seems that the bovine-skim milk derived hydrolysates BSMH and BSMF produced a larger impact on the fecal microbiota and production of SCFAs than the use of the synthetic peptides LHLPLP and HLPLP. Therefore, it would be recommended that food-fermented hydrolysates, containing beneficial peptides would be evaluated for their effect on the



microbiota and SCFAs production in human feces and, if possible, in experimental animals and human gut microbiota.

# CAPÍTULO XIII

## TRABAJO FUTURO

---



El descubrimiento y uso de antibióticos representa uno de los mayores avances científicos y médicos del siglo XX, lo que ha permitido el tratamiento de numerosas enfermedades infecciosas y mejoras en la producción animal. Actualmente, los antibióticos siguen siendo el tratamiento de elección para combatir las infecciones microbianas en personas y animales. Sin embargo, las cada vez más frecuentes resistencias antimicrobianas constituyen un problema de salud pública creciente y aconsejan la búsqueda de compuestos que reemplacen o complementen la actividad antimicrobiana de los antibióticos. En este contexto, los péptidos antimicrobianos producidos por bacterias (bacteriocinas) y los péptidos antimicrobianos producidos por eucariotas (PAMs), constituyen una de dichas alternativas. La utilización de bacterias que inhiben a otras por mecanismos de exclusión competitiva, la utilización de probióticos con actividad antimicrobiana y el empleo de bacteriófagos inhibidores del desarrollo de bacterias, constituyen otras alternativas. Sin olvidar los esfuerzos en la identificación y caracterización de compuestos de naturaleza lipoproteica y de síntesis no ribosomal, con elevada actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas de interés en la industria alimentaria, medicina humana y veterinaria y en producción animal.

De lo descrito en este trabajo se deduce el potencial de los enterococos de origen animal y/o ambiental como productores de bacteriocinas con elevada actividad antimicrobiana pero, también, como productores de enzimas liberadoras de péptidos bioactivos. En este contexto, *E. faecium* M3K31, aislado de heces de buitres leonados (*Gyps fulvus* subesp. *fulvus*) y productor de la bacteriocina de la clase IIa, denominada enterocina HF (EntHF), ha destacado por su elevada actividad antilisteriana. *E. faecium* M3K31 es sensible a la ampicilina ( $MIC \leq 2$  mg/L) y los análisis por PCR y la secuenciación de su genoma han demostrado la ausencia en su genoma de la secuencia de inserción *IS26*, del gen que codifica la proteína de superficie de enterococos (Esp) y de la enzima glicosil hidrolasa, cumpliendo los requisitos de la EFSA para permitir su uso como probiótico en nutrición animal.

Pero el que *E. faecium* M3K31 codifique genes implicados en la síntesis de otras bacteriocinas, implica un estudio más intenso de los mecanismos moleculares de regulación de la producción de dichas bacteriocinas y, concretamente, de los mecanismos de síntesis, procesamiento, transporte y secreción de la EntHF. También es conveniente desarrollar estudios que demuestren la elevada actividad antilisteriana de *E. faecium* M3K31 *in vivo* y la evaluación de mutantes isogénicos para la producción de una o más bacteriocinas por su influencia en la modificación de la microbiota de los animales que ingieren el probiótico con actividad antimicrobiana, frente a los que ingieren el probiótico sin actividad antimicrobiana. Otro enterococo de interés, aislado de heces de buitres leonados, es *E. faecalis* M3M42 que codifica los genes *gelE-sprE*, es sensible a la mayoría de los antibióticos evaluados y que no manifiesta la presencia factores importantes potenciales de virulencia, por lo que podría postularse como una cepa potencialmente útil productora de péptidos bioactivos durante su desarrollo en leche desnatada de vaca u otros sustratos proteicos alimentarios.

En este trabajo también se ha determinado la dificultad de aislar de heces de buitres leonados bacterias lácticas (BAL) con actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-negativas como *Campylobacter* spp. Por ello, debería realizarse un mayor esfuerzo investigador para el

aislamiento e identificación de grupos microbianos, distintos de las BAL, por su actividad antimicrobiana frente a *Campylobacter* spp. no solamente en heces de buitres leonados sino, también, en otros reservorios animales y alimentarios.

La producción heteróloga de bacteriocinas y otros péptidos antimicrobianos por otras BAL y levaduras puede permitir no solamente su producción por microorganismos más seguros sino, también, una mayor producción y expresión funcional frente a su obtención por síntesis química. Es verdad que durante el desarrollo de este trabajo se han encontrado numerosas dificultades para la producción y expresión funcional de bacteriocinas y otros PAMs por levaduras. Pero también es verdad que el conocimiento generado va a permitir el diseño de bacteriocinas quimeras adaptadas a su producción por, al menos *P. pastoris*, así como de bacteriocinas-PAMs quimeras cuya estructura tridimensional (3D), actividad antimicrobiana y espectro de acción debería evaluarse con mayor profundidad en un futuro próximo. Por ello, resultan necesarios la realización de más estudios que definan el papel de la región N-terminal de la enterocina A (EntA) y enterocina P (EntP) como péptidos lanzadera que dirijan la expresión, procesamiento y secreción de otras bacteriocinas quimeras, así como del papel de los aminoácidos de la región C-terminal de bacteriocinas quimeras o de bacteriocinas-PAMs quimeras, en su actividad antimicrobiana y modo de acción. Tampoco debería abandonarse el diseño y producción recombinante de quimeras con mayor actividad antimicrobiana y espectro de acción, específico o ampliado, que permitan su posible empleo como conservantes alimentarios pero también como posibles agentes terapéuticos en medicina humana y veterinaria y en producción animal.

En este trabajo se han utilizado técnicas de dicroísmo circular (DC) y de resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$ -RMN) para determinar la estructura tridimensional (3D) en solución de la enterocina HF (EntHF). El conocimiento y manejo de ambas técnicas y, sobre todo, de la de RMN son necesarias para la determinación de la estructura tridimensional *de novo* de cualquier péptido o proteína. Pero también el manejo de las plataformas I-Tasser y del programa PyMOL son convenientes para determinar la estructura tridimensional (3D) de bacteriocinas quimeras y de bacteriocinas-PAMs quimeras antes de su diseño, clonación y expresión funcional por microorganismos recombinantes. El uso de plataformas de simulación de estructuras terciarias de proteínas, sin duda, contribuirá al éxito de la producción heteróloga de bacteriocinas y de sus quimeras, anticipando la estructuras funcionales que adoptarían los péptidos sintetizados.

También debería realizarse un mayor esfuerzo investigador para sustituir los marcadores de selección de los vectores de expresión hasta ahora utilizados y con genes de resistencia a antibióticos por vectores de expresión de “grado alimentario”. Otra alternativa sería la producción heteróloga de bacteriocinas, bacteriocinas quimeras y bacteriocinas-PAMs quimeras en plantas modificadas genéticamente. La mejora genética de plantas ha permitido mejoras nutricionales importantes en el maíz, la soja, el algodón, la colza y el arroz y mejoras para su resistencia frente bacterias, virus y hongos patógenos. Sin embargo, la producción de bacteriocinas y otros péptidos antimicrobianos en plantas para mejorar su producción y facilitar purificación, no se ha explorado mucho todavía. Además, las plantas podrían

constituir una buena alternativa para la producción y expresión de péptidos antimicrobianos difíciles de expresar en hospedadores microbianos o que generan problemas por toxicidad.

La purificación a homogeneidad de las bacteriocinas, PAMs y de sus quimeras de los sobrenadantes de levaduras recombinantes mediante un procedimiento multicromatográfico, previamente empleado en la purificación de bacteriocinas, ha mostrado poca eficacia en la purificación a homogeneidad de algunas de ellas. Por ello, otra de las cuestiones a resolver en el futuro próximo será el del desarrollo y evaluación de procedimientos específicos y más eficaces de purificación a homogeneidad de cada bacteriocina o de sus quimeras, de los sobrenadantes de los cultivos productores. Sin una concentración o purificación más eficaz de las bacteriocinas o de sus quimeras, producidas por hospedadores recombinantes, no será posible competir con garantías frente a su producción por síntesis química. Otra actividad a desarrollar será la de comparar, sistemáticamente, la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas y de sus quimeras recombinantes frente a las obtenidas por síntesis química.

Durante la realización de este trabajo ha sido de gran interés el aprendizaje y uso de metodologías, plataformas y técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) que han permitido determinar la secuencia genómica de dos enterocos, *E. faecium* M3K31 y *E. faecalis* DBH18 y de reforzar su potencial biotecnológico y posibles aplicaciones. La determinación de la secuencia genómica de cualquier microorganismo de interés biotecnológico, sin duda ayudará a determinar características metabólicas y genéticas que hasta hace muy poco tiempo requerían mucho tiempo elucidar. Las nuevas técnicas de secuenciación genómica también pueden permitir la identificación de nuevas bacteriocinas o péptidos antimicrobianos, todavía no descritos. Es más, aún cuando un microorganismo no las produzca por estar sometidas a regulación o por mutaciones en los genes que dirigen su procesamiento, transporte y secreción la clonación y expresión de genes sintéticos que dirigen su síntesis, podría permitir la caracterización de su función.

Durante la realización de este trabajo también ha sido de gran interés el aprendizaje y uso de técnicas de secuenciación masiva, basadas en la amplificación y secuenciación de genes que sintetizan 16S rRNAs y que permiten, mediante la utilización de programas bioinformáticos, la identificación y posibles modificaciones de la microbiota de nichos ecológicos diferentes. Durante la realización de este trabajo se ha determinado que hidrolizados lácteos fermentados, derivados del desarrollo de *E. faecalis* DBH18 en leche desnatada de vaca, originan pequeñas variaciones en la microbiota fecal humana y, por ende, en la composición de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs), que conviene reforzar con el análisis estadístico de un mayor número de muestras. Sin embargo, el empleo de dos péptidos sintéticos con actividad antihipertensiva, presentes en los hidrolizados lácteos fermentados previamente citados, no originaron modificaciones elevadas de la microbiota fecal humana ni de producción de SCFAs. La determinación del efecto de hidrolizados alimentarios enriquecidos en péptidos bioactivos o el efecto de péptidos bioactivos sintetizados químicamente o purificados de los hidrolizados alimentarios de los que proceden, abren una interesante línea de investigación para determinar el efecto de ambos en la microbiota animal y humana y en la producción de metabolitos

derivados de su desarrollo o inhibición y con una marcada influencia en la salud animal y humana.

# CAPÍTULO XIV

## BIBLIOGRAFÍA

---





- Abee, T., 1995. Pore-forming bacteriocins of gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 129, 1–10.
- Adams, M.R., 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 68, 171–178.
- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., Schwab, H., 2014. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 5301–5317.
- Ahn, J., Hong, J., Lee, H., Park, M., Lee, E., Kim, C., Choi, E., Jung, J., Lee, H., 2007. Translation elongation factor 1-alpha gene from *Pichia pastoris*: molecular cloning, sequence, and use of its promoter. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 601–608.
- Ahn, J., Hong, J., Park, M., Lee, H., Lee, E., Kim, C., Lee, J., Choi, E., Jung, J., Lee, H., 2009. Phosphate-responsive promoter of a *Pichia pastoris* sodium phosphate symporter. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3528–3534.
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., Kuipers, O.P., 2016. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2939–2951.
- Amara, A.A., Shibl, A., 2015. Role of probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi Pharm. J.* 23, 107–114.
- And, H.C., Hoover, D. g., 2003. Bacteriocins and their food applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2, 82–100.
- Antoni Margalida, M.À.C., 2012. Modelling the effects of sanitary policies on European vulture conservation. *Sci. Rep.* 2, 753.
- Aranha, C., Gupta, S., Reddy, K.V.R., 2004. Contraceptive efficacy of antimicrobial peptide Nisin: *in vitro* and *in vivo* studies. *Contraception* 69, 333–338.
- Araújo, T.F., Ferreira, C.L. de L.F., 2013. The genus *Enterococcus* as probiotic: safety concerns. *Braz. Arch. Biol. Techn.* 56, 457–466.
- Araújo, C., Muñoz-Atienza, E., Nahuelquín, Y., Poeta, P., Igrejas, G., Hernández, P.E., Herranz, C., Cintas, L.M., 2015. Inhibition of fish pathogens by the microbiota from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and rearing environment. *Anaerobe* 32, 7–14.
- Arbulu, S., Jiménez, J.J., Gútiez, L., Cintas, L.M., Herranz, C., Hernández, P.E., 2015. Cloning and expression of synthetic genes encoding the broad antimicrobial spectrum bacteriocins SRCAM 602, OR-7, E-760, and L-1077, by recombinant *Pichia pastoris*. *BioMed Res. Int.* 2015:767183.
- Arias, C.A., Murray, B.E., 2012. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 266–278.
- Avershina, E., Storrø, O., Øien, T., Johnsen, R., Pope, P., Rudi, K., 2014. Major faecal microbiota shifts in composition and diversity with age in a geographically restricted cohort of mothers and their children. *FEMS Microbiol. Ecol.* 87, 280–290.
- Azpiroz, M.F., Poey, M.E., Laviña, M., 2009. Microcins and urovirulence in *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.* 47, 274–280.
- Bahar, A.A., Ren, D., 2013. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals* 6, 1543–1575.
- Bals, R., 2000. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir. Res.* 1, 141–150.
- Bals, R., Weiner, D.J., Meegalla, R.L., Wilson, J.M., 1999a. Transfer of a cathelicidin peptide antibiotic gene restores bacterial killing in a cystic fibrosis xenograft model. *J. Clin. Invest.*

- 103, 1113–1117.
- Bals, R., Weiner, D.J., Moscioni, A.D., Meegalla, R.L., Wilson, J.M., 1999b. Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infect. Immun.* 67, 6084–6089.
- Basanta, A., 2007. Evaluación de la enterocina L50 (L50 A y L50 B) de *Enterococcus faecium* L50 como bioconservante de la cerveza. Producción y secreción heteróloga de las enterocinas L50A y L50B en *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Basanta, A., Herranz, C., Gutiérrez, J., Criado, R., Hernández, P.E., Cintas, L.M., 2009. Development of bacteriocinogenic strains of *Saccharomyces cerevisiae* heterologously expressing and secreting the leaderless enterocin L50 peptides L50A and L50B from *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2382–2392.
- Basanta, A., Gómez-Sala, B., Sánchez, J., Diep, D.B., Herranz, C., Hernández, P.E., Cintas, L.M., 2010. Use of the yeast *Pichia pastoris* as an expression host for secretion of enterocin L50, a leaderless two-Peptide (L50A and L50B) bacteriocin from *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3314–3324.
- Bastos, M.C.F., Ceotto, H., Coelho, M.L.V., Nascimento, J.S., 2009. Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10, 38–61.
- Beaulieu, L., Groleau, D., Miguez, C.B., Jetté, J.-F., Aomari, H., Subirade, M., 2005. Production of pediocin PA-1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* reveals unexpected inhibition of its biological activity due to the presence of collagen-like material. *Protein Expr. Purif.* 43, 111–125.
- Bentley, D.R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H.P., Smith, G.P., Milton, J., Brown, C.G., Hall, K.P., Evers, D.J., Barnes, C.L., Bignell, H.R., Boutell, J.M., Bryant, J., Carter, R.J., Keira Cheetham, R., Cox, A.J., Ellis, D.J., Flatbush, M.R., Gormley, N.A., Humphray, S.J., Irving, L.J., Karbelashvili, M.S., Kirk, S.M., Li, H., Liu, X., Maisinger, K.S., Murray, L.J., Obradovic, B., Ost, T., Parkinson, M.L., Pratt, M.R., Rasolonjatovo, I.M.J., Reed, M.T., Rigatti, R., Rodighiero, C., Ross, M.T., Sabot, A., Sankar, S.V., Scally, A., Schroth, G.P., Smith, M.E., Smith, V.P., Spiridou, A., Torrance, P.E., Tzonev, S.S., Vermaas, E.H., Walter, K., Wu, X., Zhang, L., Alam, M.D., Anastasi, C., Aniebo, I.C., Bailey, D.M.D., Bancarz, I.R., Banerjee, S., Barbour, S.G., Baybayan, P.A., Benoit, V.A., Benson, K.F., Bevis, C., Black, P.J., Boodhun, A., Brennan, J.S., Bridgham, J.A., Brown, R.C., Brown, A.A., Buermann, D.H., Bundu, A.A., Burrows, J.C., Carter, N.P., Castillo, N., Chiara E Catenazzi, M., Chang, S., Neil Cooley, R., Crake, N.R., Dada, O.O., Diakoumakos, K.D., Dominguez-Fernandez, B., Earnshaw, D.J., Egbujor, U.C., Elmore, D.W., Etchin, S.S., Ewan, M.R., Fedurco, M., Fraser, L.J., Fuentes Fajardo, K.V., Scott Furey, W., George, D., Gietzen, K.J., Goddard, C.P., Golda, G.S., Granieri, P.A., Green, D.E., Gustafson, D.L., Hansen, N.F., Harnish, K., Haudenschild, C.D., Heyer, N.I., Hims, M.M., Ho, J.T., Horgan, A.M., Hoschler, K., Hurwitz, S., Ivanov, D.V., Johnson, M.Q., James, T., Huw Jones, T.A., Kang, G.-D., Kerelska, T.H., Kersey, A.D., Khrebtukova, I., Kindwall, A.P., Kingsbury, Z., Kokko-Gonzales, P.I., Kumar, A., Laurent, M.A., Lawley, C.T., Lee, S.E., Lee, X., Liao, A.K., Loch, J.A., Lok, M., Luo, S., Mammen, R.M., Martin, J.W., McCauley, P.G., McNitt, P., Mehta, P., Moon, K.W., Mullens, J.W., Newington, T., Ning,

- Z., Ling Ng, B., Novo, S.M., O'Neill, M.J., Osborne, M.A., Osnowski, A., Ostadan, O., Paraschos, L.L., Pickering, L., Pike, A.C., Pike, A.C., Chris Pinkard, D., Pliskin, D.P., Podhasky, J., Quijano, V.J., Raczy, C., Rae, V.H., Rawlings, S.R., Chiva Rodriguez, A., Roe, P.M., Rogers, J., Rogert Bacigalupo, M.C., Romanov, N., Romieu, A., Roth, R.K., Rourke, N.J., Ruediger, S.T., Rusman, E., Sanches-Kuiper, R.M., Schenker, M.R., Seoane, J.M., Shaw, R.J., Shiver, M.K., Short, S.W., Sizto, N.L., Sluis, J.P., Smith, M.A., Ernest Sohna Sohna, J., Spence, E.J., Stevens, K., Sutton, N., Szajkowski, L., Tregidgo, C.L., Turcatti, G., Vandevondele, S., Verhovsky, Y., Virk, S.M., Wakelin, S., Walcott, G.C., Wang, J., Worsley, G.J., Yan, J., Yau, L., Zuerlein, M., Rogers, J., Mullikin, J.C., Hurles, M.E., McCooke, N.J., West, J.S., Oaks, F.L., Lundberg, P.L., Klenerman, D., Durbin, R., Smith, A.J., 2008. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456, 53–59.
- Birri, D.J., Brede, D.A., Forberg, T., Holo, H., Nes, I.F., 2010. Molecular and genetic characterization of a novel bacteriocin locus in *Enterococcus avium* isolates from infants. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 483–492.
- Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C., Ray, B., 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1265–1267.
- Björkroth, K.J., Geisen, R., Schillinger, U., Weiss, N., De Vos, P., Holzapfel, W.H., Korkeala, H.J., Vandamme, P., 2000. Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum* sp. nov., associated with spoiled raw tomato-marinated broiler meat strips packaged under modified-atmosphere conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3764–3772.
- Blomquist, T.M., Crawford, E.L., Lovett, J.L., Yeo, J., Stanoszek, L.M., Levin, A., Li, J., Lu, M., Shi, L., Muldrew, K., Willey, J.C., 2013. Targeted RNA-sequencing with competitive multiplex-PCR amplicon libraries. *PLoS ONE* 8, e79120.
- Böer, E., Steinborn, G., Kunze, G., Gellissen, G., 2007. Yeast expression platforms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 513–523.
- Boman, H.G., Agerberth, B., Boman, A., 1993. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect. Immun.* 61, 2978–2984.
- Borrero, J., Brede, D.A., Skaugen, M., Diep, D.B., Herranz, C., Nes, I.F., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2011a. Characterization of garvicin ML, a novel circular bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 369–373.
- Borrero, J., Jiménez, J.J., Gútiez, L., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2011b. Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 156, 76–86.
- Borrero, J., Kunze, G., Jiménez, J.J., Böer, E., Gútiez, L., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2012a. Cloning, production, and functional expression of the bacteriocin enterocin A, produced by *Enterococcus faecium* T136, by the yeasts *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, and *Arxula adeninivorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5956–5961.
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J.C., Gerds, M.L., Hammes, W.P.,

- Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I.B., Prajapati, J.B., Seto, Y., Ter Schure, E., Van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgodar, A., Tuijelaars, S., Hansen, E.B., 2012. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *Int J. Food Microbiol.* 154, 87–97.
- Borrero, J., Kunze, G., Jiménez, J.J., Böer, E., Gútiez, L., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2012b. Cloning, production, and functional expression of the bacteriocin enterocin A, produced by *Enterococcus faecium* T136, by the yeasts *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, and *Arxula adeninivorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5956–5961.
- Bowdish, D.M.E., Davidson, D.J., Lau, Y.E., Lee, K., Scott, M.G., Hancock, R.E.W., 2005. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J. Leukoc. Biol.* 77, 451–459.
- Bower, C.K., Parker, J.E., Higgins, A.Z., Oest, M.E., Wilson, J.T., Valentine, B.A., Bothwell, M.K., McGuire, J., 2002. Protein antimicrobial barriers to bacterial adhesion: *in vitro* and *in vivo* evaluation of nisin-treated implantable materials. *Colloids Surf., B* 25, 81–90.
- Breukink, E., Wiedemann, I., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Sahl, H.G., de Kruijff, B., 1999. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* 286, 2361–2364.
- Brown, K.L., Hancock, R.E.W., 2006. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 24–30.
- Bulet, P., Stöcklin, R., 2005. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Pept. Lett.* 12, 3–11.
- Budič, M., Rijavec, M., Petkovšek, Z., Zgur-Bertok, D., 2011. *Escherichia coli* bacteriocins: antimicrobial efficacy and prevalence among isolates from patients with bacteraemia. *PLoS ONE* 6, e28769.
- Burrowes, O.J., Hadjicharalambous, C., Diamond, G., Lee, T.-C., 2004. Evaluation of antimicrobial spectrum and cytotoxic activity of pleurocidin for food applications. *J. Food Sci.* 69, FMS66–FMS71.
- Burrowes, O.-J., Diamond, G., Lee, T.-C., 2005. Recombinant expression of pleurocidin cDNA using the *Pichia pastoris* expression system. *J. Biomed. Biotechnol.* 2005, 374–384.
- Butt, T.R., Edavettal, S.C., Hall, J.P., Mattern, M.R., 2005. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr. Purif.* 43, 1–9.
- Byappanahalli, M.N., Nevers, M.B., Korajkic, A., Staley, Z.R., Harwood, V.J., 2012. *Enterococci* in the environment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 685–706.
- Cabral, K.M.S., Almeida, M.S., Valente, A.P., Almeida, F.C.L., Kurtenbach, E., 2003. Production of the active antifungal *Pisum sativum* defensin 1 (Psd1) in *Pichia pastoris*: overcoming the inefficiency of the STE13 protease. *Protein Expr. Purif.* 31, 115–122.
- Calo-Mata, P., Arlindo, S., Boehme, K., Miguel, T. de, Pascoal, A., Barros-Velazquez, J., 2007. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. *Food Bioprocess Technol.* 1, 43–63.
- Campbell, I., 1997. Food microbiology: fundamentals and frontiers, in: Beer. *ASM Press*, Nueva York, NY, EE.UU., pp. 662–670.
- Carr, F.J., Chill, D., Maida, N., 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 28, 281–370.
- Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernández, P.E., Holo, H., 1997. Enterocin B, a

- new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143 (Pt7), 2287–2294.
- Cascales, E., Buchanan, S.K., Duché, D., Kleanthous, C., Lloubès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., Cavard, D., 2007. Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 158–229.
- Cereghino, J.L., Cregg, J.M., 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 45–66.
- Chang, K., Elledge, S.J., Hannon, G.J., 2006. Lessons from Nature: microRNA-based shRNA libraries. *Nat. Meth.* 3, 707–714.
- Chang, T.L., Klotman, M.E., 2004. Defensins: natural anti-HIV peptides. *AIDS Rev* 6, 161–168.
- Chan, Y.R., Gallo, R.L., 1998. PR-39, a syndecan-inducing antimicrobial peptide, binds and affects p130(Cas). *J. Biol. Chem.* 273, 28978–28985.
- Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L., van der Donk, W.A., 2005. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem. Rev.* 105, 633–684.
- Chaucheyras-Durand, F., Durand, H., 2010. Probiotics in animal nutrition and health. *Benef. Microbes* 1, 3–9.
- Cheigh, C.-I., Pyun, Y.-R., 2005. Nisin biosynthesis and its properties. *Biotechnol. Lett.* 27, 1641–1648.
- Chen, J.-J., Chen, G.-H., Hsu, H.-C., Li, S.-S., Chen, C.-S., 2004. Cloning and functional expression of a mungbean defensin VrD1 in *Pichia pastoris*. *J. Agric. Food Chem.* 52, 2256–2261.
- Chen, Z., Wang, D., Cong, Y., Wang, J., Zhu, J., Yang, J., Hu, Z., Hu, X., Tan, Y., Hu, F., Rao, X., 2011. Recombinant antimicrobial peptide hPAB- $\beta$  expressed in *Pichia pastoris*, a potential agent active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 281–291.
- Chiu, R.W.K., Chan, K.C.A., Gao, Y., Lau, V.Y.M., Zheng, W., Leung, T.Y., Foo, C.H.F., Xie, B., Tsui, N.B.Y., Lun, F.M.F., Zee, B.C.Y., Lau, T.K., Cantor, C.R., Lo, Y.M.D., 2008. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 20458–20463.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Håvarstein, L.S., Hernández, P.E., Nes, I.F., 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4321–4330.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Holo, H., Hernandez, P.E., Nes, I.F., Håvarstein, L.S., 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* 180, 1988–1994.
- Cintas, L. M., P. Casaus y P. E. Hernández, 2000a. Bacterias lácticas de origen alimentario. Consideraciones taxonómicas y filogenéticas. *Alimentaria*, 318: 61-70.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Håvarstein, L.S., Holo, H., Hernández, P.E., Nes, I.F., 2000b. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* 182, 6806–6814.

- Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F., Hernández, P.E., 2001. Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Int. J. Food Sci. Tech.* 7, 281–305.
- Cipáková, I., Hostinová, E., 2005. Production of the human-beta-defensin using *Saccharomyces cerevisiae* as a host. *Protein Pept. Lett.* 12, 551–554.
- Claesson, M.J., van Sinderen, D., O'Toole, P.W., 2007. The genus *Lactobacillus*--a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiol. Lett.* 269, 22–28.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71, 1–20.
- Cole, A.M., Weis, P., Diamond, G., 1997. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *J. Biol. Chem.* 272, 12008–12013.
- Cole, A.M., Darouiche, R.O., Legarda, D., Connell, N., Diamond, G., 2000. Characterization of a fish antimicrobial peptide: gene expression, subcellular localization, and spectrum of activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2039–2045.
- Cole, K., Farnell, M.B., Donoghue, A.M., Stern, N.J., Svetoch, E.A., Eruslanov, B.N., Volodina, L.I., Kovalev, Y.N., Pereygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Levchuk, V.P., Pokhilenko, V.D., Borzenkov, V.N., Svetoch, O.E., Kudryavtseva, T.Y., Reyes-Herrera, I., Blore, P.J., Santos, F.S. de los, Donoghue, D.J., 2006. Bacteriocins reduce *Campylobacter* colonization and alter gut morphology in turkey poults. *Poult. Sci.* 85, 1570–1575.
- Collins, B., P. D. Cotter, C. Hill y R. P. Ross. 2010. Application of lactic acid bacteria-produced bacteriocins. En: *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*, pp. 89-109, 1ª edición. Mozzì, F., R. R. Raya y G. M. Vignolo (eds.). Wiley-Blackwell, Oxford, Reino Unido.
- Consortium, T. 1000 G.P., 2010. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467, 1061–1073.
- Corbier, C., Krier, F., Mulliert, G., Vitoux, B., Revol-Junelles, A.-M., 2001. Biological Activities and Structural Properties of the Atypical Bacteriocins Mesenterocin 52B and Leucocin B-TA33a. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1418–1422.
- Corr, S.C., Hill, C., Gahan, C.G.M., 2009. Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens. *Adv. Food Nutr. Res.* 56, 1–15.
- Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J.L., Valero, F., 2006. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. *Microb. Cell Fact.* 5, 17.
- Costa, F., Carvalho, I.F., Montelaro, R.C., Gomes, P., Martins, M.C.L., 2011. Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta Biomater.* 7, 1431–1440.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 777–788.
- Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C., 2013. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 95–105.
- Crandall, A.D., Montville, T.J., 1998. Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 231–237.
- Cregg, J.M., Barringer, K.J., Hessler, A.Y., Madden, K.R., 1985. *Pichia pastoris* as a host

- system for transformations. *Mol. Cell. Biol.* 5, 3376–3385.
- Cregg, J.M., Madden, K.R., Barringer, K.J., Thill, G.P., Stillman, C.A., 1989. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1316–1323.
- Cregg, J.M., Vedvick, T.S., Raschke, W.C., 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotech. (N.Y.)* 11, 905–910.
- Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J., Higgins, D.R., 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* 16, 23–52.
- Cregg J, Tolstorukov I (2012) P. pastoris ADH promoter and use thereof to direct expression of proteins. United States patent US 8,222,386.
- Cregg, J.M., 2013. *Pichia* system history: man5 man8 | *Pichia pastoris* protein expression platform: Eukaryotic Protein Expression, 2013. Keck Graduate Institute, Claremont, California, USA.
- Criado, R., Gutiérrez, J., Martín, M., Herranz, C., Hernández, P.E., Cintas, L.M., 2006. Immunochemical characterization of temperature-regulated production of enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), enterocin P, and enterocin Q by *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7634–7643.
- Cui, Y., Zhang, C., Wang, Y., Shi, J., Zhang, L., Ding, Z., Qu, X., Cui, H., 2012. Class IIa bacteriocins: diversity and new developments. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 16668–16707.
- Currie, S.M., Gwyer Findlay, E., McFarlane, A.J., Fitch, P.M., Böttcher, B., Colegrave, N., Paras, A., Jozwik, A., Chiu, C., Schwarze, J., Davidson, D.J., 2016. Cathelicidins have direct antiviral activity against respiratory syncytial virus *in vitro* and protective function *in vivo* in mice and humans. *J. Immunol.* 196(6):2699–710.
- Dalet, K., Briand, C., Cenatiempo, Y., Héchard, Y., 2000. The rpoN gene of *Enterococcus faecalis* directs sensitivity to subclass IIa bacteriocins. *Curr. Microbiol.* 41, 441–443.
- Dalhus, B., Johnsen, L., Nissen-Meyer, J., 2003. Crystallization and preliminary X-ray data investigation of the bacterial enterocin A immunity protein at 1.65 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 59, 1291–1293.
- Daly, R., Hearn, M.T.W., 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.* 18, 119–138.
- Das, S., Hollenberg, C.P., 1982. A high-frequency transformation system for the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Curr. Genet.* 6, 123–128.
- Dassa, E. y P. Bouige. 2001. The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res. Microbiol.*, 152: 211–229.
- Dayem, M.A., Fleury, Y., Devilliers, G., Chaboisseau, E., Girard, R., Nicolas, P., Delfour, A., 1996. The putative immunity protein of the gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides* is preferentially located in the cytoplasm compartment. *FEMS Microbiol. Lett.* 138, 251–259.
- de Almeida, J.R.M., de Moraes, L.M.P., Torres, F.A.G., 2005. Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (PGK1) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Yeast* 22, 725–737.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P., 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.*, 4<sup>th</sup> NIZO Dairy Conference - Prospects



- for Health, Well-being and Safety 16, 1058–1071.
- de Jong, A., van Hijum, S.A.F.T., Bijlsma, J.J.E., Kok, J., Kuipers, O.P., 2006. BAGEL: a web-based bacteriocin genome mining tool. *Nucleic Acids Res.* 34, W273–279.
- De Smet, K., Contreras, R., 2005. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol. Lett.* 27, 1337–1347.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J., Hugenholtz, J., 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek* 69, 193–202.
- den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., Bakker, B.M., 2013. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.* 54, 2325–2340.
- Denis-Quanquin, S., Lamouroux, L., Lougarre, A., Mahéo, S., Saves, I., Paquereau, L., Demange, P., Fournier, D., 2007. Protein expression from synthetic genes: Selection of clones using GFP. *J. of Biotechnol.* 131, 223–230. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.07.725.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Strub, J.-M., van Dorsselaer, A., Bachère, E., 1999. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *Eur. J. of Biochem.* 266, 335–346.
- Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., Rebuffat, S., 2002. Focus on modified microcins: structural features and mechanisms of action. *Biochimie* 84, 511–519.
- De Vos, P., G. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K. H. Schleifer y W. B. Whitman. 2009. The Firmicutes. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 3, 2a edición. Springer, Nueva York, NY, EE.UU.
- De Vuyst, L., Vandamme, E.J. (Eds.), 1994. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Springer US, Boston, MA.
- Dhople, V., Krukemeyer, A., Ramamoorthy, A., 2006. The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 1499–1512.
- Diep, D.B., Nes, I.F., 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets* 3, 107–122.
- Diep, D.B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., Nes, I.F., 2007. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *PNAS* 104, 2384–2389.
- Diez-Gonzalez, F., 2007. Applications of bacteriocins in livestock. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 8, 15–23.
- Di Pierro, F., Donato, G., Fomia, F., Adami, T., Careddu, D., Cassandro, C., Albera, R., 2012. Preliminary pediatric clinical evaluation of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12 in preventing recurrent pharyngitis and/or tonsillitis caused by *Streptococcus pyogenes* and recurrent acute otitis media. *Int. J. Gen. Med.* 5, 991–997.
- Dobson, A., O'Connor, P.M., Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C., 2011. Impact of the broad-spectrum antimicrobial peptide, lactacin 3147, on *Streptococcus mutans* growing in a biofilm and in human saliva. *J. Appl. Microbiol.* 111, 1515–1523.
- Dobson, A., Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C., 2012. Bacteriocin Production: a Probiotic Trait? *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1–6.
- Donaldson, G.P., Lee, S.M., Mazmanian, S.K., 2016. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 20–32.
- Douglas, S.E., Gallant, J.W., Gong, Z., Hew, C., 2001. Cloning and developmental expression

- of a family of pleurocidin-like antimicrobial peptides from winter flounder, *Pleuronectes americanus* (Walbaum). *Dev. Comp. Immunol.* 25, 137–147.
- Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 2003. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8817–8822.
- Drider, D., Fimland, G., Héchar, Y., McMullen, L.M., Prévost, H., 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 564–582.
- Driessen, A.J.M., Nouwen, N., 2008. Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 643–667.
- Duarte, A.F. de S., Ceotto, H., Coelho, M.L.V., Brito, M.A.V. de P., Bastos, M. do C. de F., 2013. Identification of new staphylococcins with potential application as food biopreservatives. *Food Control* 32, 313–321.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., de Montigny, J., Marck, C., Neuvéglise, C., Talla, E., Goffard, N., Frangeul, L., Aigle, M., Anthouard, V., Babour, A., Barbe, V., Barnay, S., Blanchin, S., Beckerich, J.-M., Beyne, E., Bleykasten, C., Boisramé, A., Boyer, J., Cattolico, L., Confanioleri, F., de Daruvar, A., Despons, L., Fabre, E., Fairhead, C., Ferry-Dumazet, H., Groppi, A., Hantraye, F., Hennequin, C., Jauniaux, N., Joyet, P., Kachouri, R., Kerrest, A., Koszul, R., Lemaire, M., Lesur, I., Ma, L., Muller, H., Nicaud, J.-M., Nikolski, M., Oztas, S., Ozier-Kalogeropoulos, O., Pellenz, S., Potier, S., Richard, G.-F., Straub, M.-L., Suleau, A., Swennen, D., Tekaia, F., Wésolowski-Louvel, M., Westhof, E., Wirth, B., Zeniou-Meyer, M., Zivanovic, I., Bolotin-Fukuhara, M., Thierry, A., Bouchier, C., Caudron, B., Scarpelli, C., Gaillardin, C., Weissenbach, J., Wincker, P., Souciet, J.-L., 2004. Genome evolution in yeasts. *Nature* 430, 35–44.
- Duquesne, S., Petit, V., Peduzzi, J., Rebuffat, S., 2007. Structural and functional diversity of microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13, 200–209.
- Eaton, T.J., Gasson, M.J., 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1628–1635.
- EFSA. 2005. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA J.*, 226: 1-12.
- EFSA. 2007. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA J.*, 587:1-16.
- EFSA. 2012a. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J.*, 10: 2740-2749.
- EFSA. 2012b. Guidance on the safety assessment of *Enterococcus faecium* in animal nutrition. *EFSA J.*, 10: 2682. [10 pp.]
- EFSA. 2013. Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2015 update). *EFSA J.*, 11: 3449. [105 pp.]
- Eijsink, V. G. H., M. Skeie, P. H. Middelhoven, M. B. Brurberg e I. F. Nes. 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 3275-

- 3281.
- El Bassi, L., Hassouna, M., Shinzato, N., Matsui, T., 2009. Biopreservation of Refrigerated and vacuum-packed *dicentrarchus labrax* by lactic acid bacteria. *J. of Food Sci.* 74, M335–M339.
- Ellis, S.B., Brust, P.F., Koutz, P.J., Waters, A.F., Harpold, M.M., Gingeras, T.R., 1985. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* 5, 1111–1121.
- Elsbach, P., 2003. What is the real role of antimicrobial polypeptides that can mediate several other inflammatory responses? *J. Clin. Invest.* 111, 1643–1645.
- Ennahar, S., Sonomoto, K., Ishizaki, A., 1999. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *J. Biosci. Bioeng.* 87, 705–716.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A., 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 85–106.
- European Commission. 2003. On a generic approach to the safety assessment of micro-organisms used in feed/food and feed/food production. Health & Consumer Protection Directorate-General. Directorate C- Scientific Opinions. Disponible en: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out178\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out178_en.pdf).
- Eren, A.M., Sogin, M.L., Morrison, H.G., Vineis, J.H., Fisher, J.C., Newton, R.J., McLellan, S.L., 2015. A single genus in the gut microbiome reflects host preference and specificity. *ISME J.* 9, 90–100.
- European Union Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003. Appendixes 3e & 4I. Annex I: List of Additives. Edition 185. Health and Consumers Directorate General. Directorate G-Veterinary and International Affairs. Unit G1 Animal Nutrit. Disponible en: [http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/comm\\_register\\_feed\\_additives\\_1831-03.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/comm_register_feed_additives_1831-03.pdf). Fecha de consulta: junio de 2015.
- Fadrosh, D.W., Ma, B., Gajer, P., Sengamalay, N., Ott, S., Brotman, R.M., Ravel, J., 2014. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome* 2, 6.
- Fan, H.C., Blumenfeld, Y.J., Chitkara, U., Hudgins, L., Quake, S.R., 2008. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 16266–16271.
- FAO/WHO, 2002. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on guidelines for the evaluation of probiotics in food. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, London Ontario, Canada.
- FAO/WHO, 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. URL: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>
- Fath, M.J., Kolter, R., 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* 57, 995–1017.
- Fath, M.J., Zhang, L.H., Rush, J., Kolter, R., 1994. Purification and Characterization of Colicin V from *Escherichia coli* Culture Supernatants. *Biochemistry* 33, 6911–6917.
- Fedurco, M., Romieu, A., Williams, S., Lawrence, I., Turcatti, G., 2006. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Res.* 34, e22.

- Fekkes, P., Driessen, A.J.M., 1999. Protein Targeting to the Bacterial Cytoplasmic Membrane. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 161–173.
- Feng, G., Guron, G.K.P., Churey, J.J., Worobo, R.W., 2009. Characterization of mundticin L, a class IIa anti-*Listeria* bacteriocin from *Enterococcus mundtii* CUGF08. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5708–5713.
- Fernández, L., Arroyo, R., Espinosa, I., Marín, M., Jiménez, E., Rodríguez, J.M., 2014. Probiotics for human lactational mastitis. *Benef. Microbes* 5, 169–183.
- Fimland, G., Blingsmo, O.R., Sletten, K., Jung, G., Nes, I.F., Nissen-Meyer, J., 1996. New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins: the C-terminal region is important for determining specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3313–3318.
- Fimland, G., Jack, R., Jung, G., Nes, I.F., Nissen-Meyer, J., 1998. The bactericidal activity of pediocin PA-1 is specifically inhibited by a 15-mer fragment that spans the bacteriocin from the center toward the c terminus. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 5057–5060.
- Fimland, G., Johnsen, L., Axelsson, L., Brurberg, M.B., Nes, I.F., Eijsink, V.G.H., Nissen-Meyer, J., 2000. A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *J. Bacteriol.* 182, 2643–2648.
- Fimland, G., Eijsink, V.G.H., Nissen-Meyer, J., 2002. Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins. *Microbiology* 148, 3661–3670.
- Fimland, G., Johnsen, L., Dalhus, B., Nissen-Meyer, J., 2005. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *J. Pept. Sci.* 11, 688–696.
- Fleet, G.H., 1999. Microorganisms in food ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 101–117.
- Fleet, G. H., 2001. Food Microbiology: fundamentals and frontiers, in: Fleet, G. H. *ASM Press*, Nueva York, NY., EE.UU., pp. 671–694.
- Flint, H.J., Scott, K.P., Louis, P., Duncan, S.H., 2012. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 577–589.
- Foulquié Moreno, P.S., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 1–24.
- Franke, C. M., 1998. Topology of a type I secretion system for bacteriocins of *Lactococcus lactis*. *Tesis Doctoral*. Universidad de Groningen, Países Bajos.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapfel, W.H., 2003. *Enterococci* in foods—a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 105–122.
- Franz, C. M., G. S. Cho, W. H. Holzapfel y A. Gálvez. 2010. Safety of lactic acid bacteria. En: *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*, pp. 341–359, 1a edición. Mozzi, F., R. R. Raya y G. M. Vignolo (eds.). Wiley-Blackwell, Oxford, Reino Unido.
- Franz, C.M.A.P., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., Gálvez, A., 2011. *Enterococci* as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 125–140.
- Fregeau Gallagher, N.L., Sailer, M., Niemczura, W.P., Nakashima, T.T., Stiles, M.E., Vederas, J.C., 1997. Three-dimensional structure of leucocin A in trifluoroethanol and dodecylphosphocholine micelles: spatial location of residues critical for biological activity in type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry* 36, 15062–15072.
- Frumkin, D., Wasserstrom, A., Kaplan, S., Feige, U., Shapiro, E., 2005. Genomic variability

- within an organism exposes its cell lineage tree. *PLOS Comput. Biol.* 1, e50.
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365–378.
- Fullwood, M.J., Wei, C.-L., Liu, E.T., Ruan, Y., 2009. Next-generation DNA sequencing of paired-end tags (PET) for transcriptome and genome analyses. *Genome Res.* 19, 521–532.
- Gabrielsen, C., Brede, D.A., Hernández, P.E., Nes, I.F., Diep, D.B., 2012. The maltose ABC transporter in *Lactococcus lactis* facilitates high-level sensitivity to the circular bacteriocin garvicin ML. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2908–2915.
- Galloway-Peña, J.R., Rice, L.B., Murray, B.E., 2011. Analysis of PBP5 of early U.S. isolates of *Enterococcus faecium*: sequence variation alone does not explain increasing ampicillin resistance over time. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3272–3277.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L., Ben Omar, N., 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 51–70.
- Ganz, T., 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 710–720.
- Ganz, T., Lehrer, R.I., 1999. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Mol. Med. Today* 5, 292–297.
- Gao, Z., Li, Z., Zhang, Y., Huang, H., Li, M., Zhou, L., Tang, Y., Yao, B., Zhang, W., 2012. High-level expression of the *Penicillium notatum* glucose oxidase gene in *Pichia pastoris* using codon optimization. *Biotechnol. Lett.* 34, 507–514.
- Gardiner, G.E., Ross, R.P., Kelly, P.M., Stanton, C., Collins, J.K., Fitzgerald, G., 2002. Microbiology of therapeutic milks, in: Robinson, R.K. (Ed.), *Dairy Microbiology Handbook*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 431–478.
- Garneau, S., Martin, N.I., Vederas, J.C., 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84, 577–592.
- Gasser, B., Saloheimo, M., Rinas, U., Dragosits, M., Rodríguez-Carmona, E., Baumann, K., Giuliani, M., Parrilli, E., Branduardi, P., Lang, C., Porro, D., Ferrer, P., Tutino, M.L., Mattanovich, D., Villaverde, A., 2008. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microb. Cell Factories* 7, 11.
- Gellissen, G., Kunze, G., Gaillardin, C., Cregg, J.M., Berardi, E., Veenhuis, M., van der Klei, I., 2005. New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adeninivorans* and *Yarrowia lipolytica* - a comparison. *FEMS Yeast Res.* 5, 1079–1096.
- Genome 10K Community of Scientists, 2009. Genome 10K: a proposal to obtain whole-genome sequence for 10,000 vertebrate species. *J. Hered.* 100, 659–674.
- Giacometti, A., Cirioni, O., Barchiesi, F., Fortuna, M., Scalise, G., 1999. *In-vitro* activity of cationic peptides alone and in combination with clinically used antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 44, 641–645.
- Gifford, J.L., Hunter, H.N., Vogel, H.J., 2005. Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2588–2598.
- Gillor, O., Nigro, L.M., Riley, M.A., 2005. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. *Curr. Pharm. Des.* 11, 1067–1075.

- Gómez-Sala, B., Muñoz-Atienza, E., Sánchez, J., Basanta, A., Herranz, C., Hernández, P.E., Cintas, L.M., 2015. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from fish, seafood and fish products. *Eur. Food Res. Technol.* 241, 341–356.
- Gravesen, A., Ramnath, M., Rechinger, K.B., Andersen, N., Jänsch, L., Héchard, Y., Hastings, J.W., Knøchel, S., 2002. High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* 148, 2361–2369.
- Green, R.E., Krause, J., Ptak, S.E., Briggs, A.W., Ronan, M.T., Simons, J.F., Du, L., Egholm, M., Rothberg, J.M., Paunovic, M., Pääbo, S., 2006. Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. *Nature* 444, 330–336.
- Grissa, I., Vergnaud, G., Pourcel, C., 2007. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res.* 35, W52–57.
- Guder, A., Wiedemann, I., Sahl, H.G., 2000. Posttranslationally modified bacteriocins--the lantibiotics. *Biopolymers* 55, 62–73.
- Gueimonde, M., C. G. de los Reyes-Gavilán y B. Sánchez. 2012. Stability of lactic acid bacteria in foods and supplements. En: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects, pp. 361-383, 4a edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Guinane, C.M., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2005. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1316–1325.
- Gutiérrez, J., Criado, R., Martín, M., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2005. Production of enterocin P, an antilisterial pediocin-like bacteriocin from *Enterococcus faecium* p13, in *Pichia pastoris*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 3004–3008.
- Gútiez, L., Gómez-Sala, B., Recio, I., del Campo, R., Cintas, L.M., Herranz, C., Hernández, P.E., 2013. *Enterococcus faecalis* strains from food, environmental, and clinical origin produce ACE-inhibitory peptides and other bioactive peptides during growth in bovine skim milk. *Int. J. Food Microbiol.* 166, 93–101.
- Gútiez, L., Borrero, J., Jiménez, J.J., Gómez-Sala, B., Recio, I., Cintas, L.M., Herranz, C., Hernández, P.E., 2014. Genetic and biochemical evidence that recombinant *Enterococcus* spp. strains expressing gelatinase (GelE) produce bovine milk-derived hydrolysates with high angiotensin converting enzyme-inhibitory activity (ACE-IA). *J. Agric. Food Chem.* 62, 5555–5564.
- Hallock, K.J., Lee, D.-K., Ramamoorthy, A., 2003. MSI-78, an analogue of the magainin antimicrobial peptides, disrupts lipid bilayer structure via positive curvature strain. *Biophys. J.* 84, 3052–3060.
- Hancock, R.E.W., Sahl, H.-G., 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotech.* 24, 1551–1557.
- Hao, X., Yang, H., Wei, L., Yang, S., Zhu, W., Ma, D., Yu, H., Lai, R., 2012. Amphibian cathelicidin fills the evolutionary gap of cathelicidin in vertebrate. *Amino Acids* 43, 677–685.
- Harris, F., Dennison, S.R., Phoenix, D.A., 2009. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Curr. Protein Pept. Sci.* 10, 585–606.
- Hartnett, D.J., Vaughan, A., van Sinderen, D., 2002. Antimicrobial-producing lactic acid bacteria isolated from raw barley and sorghum. *J. Inst. Brew.* 108, 169–177.

- Haugen, H.S., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., Kristiansen, P.E., 2005. Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide curvacin A. *Biochemistry* 44, 16149–16157.
- Håvarstein, L.S., Holo, H., Nes, I.F., 1994. The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology* 140, 2383–2389.
- Håvarstein, L.S., Diep, D.B., Nes, I.F., 1995. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.* 16, 229–240.
- Healy, B., Field, D., O'Connor, P.M., Hill, C., Cotter, P.D., Ross, R.P., 2013. Intensive mutagenesis of the nisin hinge leads to the rational design of enhanced derivatives. *PLoS ONE* 8, e79563.
- Henderson, J.T., Chopko, A.L., van Wassenaar, P.D., 1992. Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Arch. Biochem. Biophys.* 295, 5–12.
- Heng, N.C.K., Wescombe, P.A., Burton, J.P., Jack, R.W., Tagg, J.R., 2006. The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria, en: *Bacteriocins* 45–92.
- Heng, N.C.K., Burtenshaw, G.A., Jack, R.W., Tagg, J.R., 2007. Ubericin A, a class IIa bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7763–7766.
- Herranz, C., Mukhopadhyay, S., Casaus, P., Martínez, J.M., Rodríguez, J.M., Nes, I.F., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 1999. Biochemical and genetic evidence of enterocin P production by two *Enterococcus faecium*-like strains isolated from fermented sausages. *Curr. Microbiol.* 39, 282–290.
- Herranz, C. 2001. Caracterización bioquímica y genética de enterocinas producidas por cepas de *Enterococcus faecium* de origen cárnico. Optimización de la producción y mecanismo molecular de acción de la enterocina P de *Enterococcus faecium* P13. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Hetz, C., Bono, M.R., Barros, L.F., Lagos, R., 2002. Microcin E492, a channel-forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 2696–2701.
- Higgins, D.R., Busser, K., Comiskey, J., Whittier, P.S., Purcell, T.J., Hoeffler, J.P., 1998. Small vectors for expression based on dominant drug resistance with direct multicopy selection. *Methods Mol. Biol.* 103, 41–53.
- Hodkinson, B.P., Grice, E.A., 2015. Next-generation sequencing: a review of technologies and tools for wound microbiome research. *Adv. Wound Care* (New Rochelle) 4, 50–58.
- Hollenbeck, B.L., Rice, L.B., 2012. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. *Virulence* 3, 421–433.
- Holzappel, W.H., Geisen, R., Schillinger, U., 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* 24, 343–362.
- Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U., 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 365S–373S.
- Hong, I.-P., Lee, S.-J., Kim, Y.-S., Choi, S.-G., 2007. Recombinant expression of human

- cathelicidin (hCAP18/LL-37) in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* 29, 73–78.
- Horner, D.S., Pavesi, G., Castrignanò, T., De Meo, P.D., Liuni, S., Sammeth, M., Picardi, E., Pesole, G., 2010. Bioinformatics approaches for genomics and post genomics applications of next-generation sequencing. *Brief. Bioinformatics* 11, 181–197.
- Houston, D.C., Cooper, J.E., 1975. The digestive tract of the whiteback griffon vulture and its role in disease transmission among wild ungulates. *J. Wildl. Dis.* 11, 306–313.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T., 2003. Functionality of enterococci in meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 223–233.
- Inan, M., 2000. Studies on the alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *ETD collection for University of Nebraska - Lincoln* 1–110.
- Inal, J.M., 2003. Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 51, 237–244.
- Islam, B., Khan, S.N., Khan, A.U., 2007. Dental caries: from infection to prevention. *Med. Sci. Monit.* 13, RA196–203.
- Jabrane, A., Sabri, A., Compère, P., Jacques, P., Vandenberghe, I., Beeumen, J.V., Thonart, P., 2002. Characterization of serracin P, a phage-tail-like bacteriocin, and Its activity against *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5704–5710.
- Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B., 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59, 171–200.
- Jenkins, N., Parekh, R.B., James, D.C., 1996. Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry. *Nat. Biotechnol.* 14, 975–981.
- Jia, X., Patrzykat, A., Devlin, R.H., Ackerman, P.A., Iwama, G.K., Hancock, R.E.W., 2000. Antimicrobial peptides protect coho salmon from *Vibrio anguillarum* infections. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1928–1932.
- Jiménez, J.J., Borrero, J., Diep, D.B., Gútiez, L., Nes, I.F., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2013. Cloning, production, and functional expression of the bacteriocin sakacin A (SakA) and two SakA-derived chimeras in lactic acid bacteria (LAB) and the yeasts *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40, 977–993.
- Jiménez, J.J., Borrero, J., Gútiez, L., Arbulu, S., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2014. Use of synthetic genes for cloning, production and functional expression of the bacteriocins enterocin A and bacteriocin E 50-52 by *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Biotechnol.* 56, 571–583.
- Jin, F., Xu, X., Zhang, W., Gu, D., 2006. Expression and characterization of a housefly cecropin gene in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 49, 39–46.
- Joerger, R. D., D. G. Hoover, S. F. Barefoot, K. M. Harmon, D. A. Grinstead y C. G. Nettles-Cutter., 2000. Bacteriocins, in: Encyclopedia of Microbiology. *Academic Press*, San Diego, CA, EE.UU., pp. 383–397.
- Joffraud, J.J., Leroi, F., Roy, C., Berdagué, J.L., 2001. Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* 66, 175–184.
- Johnsborg, O., Håvarstein, L.S., 2009. Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 627–642.



- Johnsen, L., Fimland, G., Mantzilas, D., Nissen-Meyer, J., 2004. Structure-function analysis of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins: C-terminal parts of immunity proteins are involved in specific recognition of cognate bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2647–2652.
- Johnsen, L., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., 2005a. The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *J. Biol. Chem.* 280, 9243–9250.
- Johnsen, L., Dalhus, B., Leiros, I., Nissen-Meyer, J., 2005b. 1.6-Angstroms crystal structure of EntA-im. A bacterial immunity protein conferring immunity to the antimicrobial activity of the pediocin-like bacteriocin enterocin A. *J. Biol. Chem.* 280, 19045–19050.
- Johnsen, J.M., Nickerson, D.A., Reiner, A.P., 2013. Massively parallel sequencing: the new frontier of hematologic genomics. *Blood* 122, 3268–3275.
- Julius, D., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R., Thorner, J., 1984. Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell* 37, 1075–1089.
- Kailasapathy, K., 2016. Commercial sources of probiotic strains and their validated and potential health benefits : a review. *Int. J. Fermented Foods* 2, 1.
- Kalmokoff, M.L., Bartlett, F., Teather, R.M., 1996. Are Ruminal Bacteria Armed with Bacteriocins?1. *J. Dairy Sci.* 79, 2297–2306.
- Kalmokoff, M.L., Banerjee, S.K., Cyr, T., Hefford, M.A., Gleeson, T., 2001. Identification of a new plasmid-encoded sec-dependent bacteriocin produced by *Listeria innocua* 743. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4041–4047.
- Kang, H.A., Choi, E.S., Hong, W.K., Kim, J.Y., Ko, S.M., Sohn, J.H., Rhee, S.K., 2000. Proteolytic stability of recombinant human serum albumin secreted in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 575–582.
- Kant, P., Liu, W.-Z., Pauls, K.P., 2009. PDC1, a corn defensin peptide expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* inhibits growth of *Fusarium graminearum*. *Peptides* 30, 1593–1599.
- Kaur, K., Andrew, L.C., Wishart, D.S., Vederas, J.C., 2004. Dynamic relationships among type IIa bacteriocins: temperature effects on antimicrobial activity and on structure of the C-terminal amphipathic alpha helix as a receptor-binding region. *Biochemistry* 43, 9009–9020.
- Kawai, Y., Kemperman, R., Kok, J., Saito, T., 2004. The circular bacteriocins gassericin A and circularin A. *Curr. Protein Pept. Sci.* 5, 393–398.
- Kawamoto, S., Shima, J., Sato, R., Eguchi, T., Ohmomo, S., Shibato, J., Horikoshi, N., Takeshita, K., Sameshima, T., 2002. Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3830–3840.
- Kemperman, R., Kuipers, A., Karsens, H., Nauta, A., Kuipers, O., Kok, J., 2003. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1589–1597.
- Khan, H., Flint, S., Yu, P.-L., 2010. Enterocins in food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 141, 1–10.

- Kim, I.-K., Kim, M.-K., Kim, J.-H., Yim, H.-S., Cha, S.-S., Kang, S.-O., 2007. High resolution crystal structure of PedB: a structural basis for the classification of pediocin-like immunity proteins. *BMC Struct. Biol.* 7, 35.
- Kim, S., Quan, R., Lee, S.-J., Lee, H.-K., Choi, J.-K., 2009. Antibacterial activity of recombinant hCAP18/LL37 protein secreted from *Pichia pastoris*. *J. Microbiol.* 47, 358–362.
- Kim, S., Warburton, S., Boldogh, I., Svensson, C., Pon, L., d’Anjou, M., Stadheim, T.A., Choi, B.-K., 2013. Regulation of alcohol oxidase 1 (AOX1) promoter and peroxisome biogenesis in different fermentation processes in *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* 166, 174–181.
- Kingsmore, S.F., Saunders, C.J., 2011. Deep sequencing of patient genomes for disease diagnosis: when will it become routine? *Sci. Transl. Med.* 3, 87ps23.
- Kjos, M., Salehian, Z., Nes, I.F., Diep, D.B., 2010. An extracellular loop of the mannose phosphotransferase system component iic is responsible for specific targeting by class IIa bacteriocins. *J. Bacteriol.* 192, 5906–5913.
- Kjos, M., Borrero, J., Opsata, M., Birri, D.J., Holo, H., Cintas, L.M., Snipen, L., Hernández, P.E., Nes, I.F., Diep, D.B., 2011. Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology* 157, 3256–3267.
- Kjos, M., Oppegård, C., Diep, D.B., Nes, I.F., Veening, J.-W., Nissen-Meyer, J., Kristensen, T., 2014. Sensitivity to the two-peptide bacteriocin lactococcin G is dependent on UppP, an enzyme involved in cell-wall synthesis. *Mol. Microbiol.* 92, 1177–1187.
- Klaenhammer, T.R., 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70, 337–349.
- Knerr, P.J., van der Donk, W.A., 2012. Discovery, biosynthesis, and engineering of lantipeptides. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 479–505.
- Koboldt, D.C., Ding, L., Mardis, E.R., Wilson, R.K., 2010. Challenges of sequencing human genomes. *Brief. Bioinformatics* 11, 484–498.
- Koczulla, R., von Degenfeld, G., Kupatt, C., Krötz, F., Zahler, S., Gloe, T., Issbrücker, K., Unterberger, P., Zaiou, M., Lebherz, C., Karl, A., Raake, P., Pfosser, A., Boekstegers, P., Welsch, U., Hiemstra, P.S., Vogelmeier, C., Gallo, R.L., Clauss, M., Bals, R., 2003. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J. Clin. Invest.* 111, 1665–1672.
- Kok, J., Buist, G., Zomer, A.L., van Hijum, S.A.F.T., Kuipers, O.P., 2005. Comparative and functional genomics of lactococci. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 411–433.
- Kościuczuk, E.M., Lisowski, P., Jarczak, J., Strzałkowska, N., Jóźwik, A., Horbańczuk, J., Krzyżewski, J., Zwierzchowski, L., Bagnicka, E., 2012. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Mol. Biol. Rep.* 39, 10957–10970.
- Kostic, A.D., Howitt, M.R., Garrett, W.S., 2013. Exploring host-microbiota interactions in animal models and humans. *Genes Dev.* 27, 701–718.
- Koutz, P., Davis, G.R., Stillman, C., Barringer, K., Cregg, J., Thill, G., 1989. Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast* 5, 167–177.
- Kramer, N.E., van Hijum, S.A.F.T., Knol, J., Kok, J., Kuipers, O.P., 2006. Transcriptome analysis reveals mechanisms by which *Lactococcus lactis* acquires nisin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1753–1761.

- Kwok, L.Y., Guo, Z., Zhang, J., Wang, L., Qiao, J., Hou, Q., Zheng, Y., Zhang, H., 2015. The impact of oral consumption of *Lactobacillus plantarum* P-8 on faecal bacteria revealed by pyrosequencing. *Benef. Microbes* 6, 405–413.
- Lagos, R., Tello, M., Mercado, G., García, V., Monasterio, O., 2009. Antibacterial and antitumorigenic properties of microcin E492, a pore-forming bacteriocin. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10, 74–85.
- Lange, V., Böhme, I., Hofmann, J., Lang, K., Sauter, J., Schöne, B., Paul, P., Albrecht, V., Andreas, J.M., Baier, D.M., Nething, J., Ehninger, U., Schwarzelt, C., Pingel, J., Ehninger, G., Schmidt, A.H., 2014. Cost-efficient high-throughput HLA typing by MiSeq amplicon sequencing. *BMC Genomics* 15, 63.
- Lauková, Czikková, 1998. Inhibition effect of enterocin CCM 4231 in the rumen fluid environment. *Letters in Appl. Microbiol.* 26, 215–218.
- Lee, J.-H., O'Sullivan, D.J., 2010. Genomic insights into bifidobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 74, 378–416.
- Lee, J.H., Daugharthy, E.R., Scheiman, J., Kalhor, R., Yang, J.L., Ferrante, T.C., Terry, R., Jeanty, S.S.F., Li, C., Amamoto, R., Peters, D.T., Turczyk, B.M., Marblestone, A.H., Inverso, S.A., Bernard, A., Mali, P., Rios, X., Aach, J., Church, G.M., 2014. Highly multiplexed subcellular RNA sequencing *in situ*. *Science* 343, 1360–1363.
- Leer, R.J., van der Vossen, J.M., van Giezen, M., van Noort, J.M., Pouwels, P.H., 1995. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology* 141 (Pt7), 1629–1635.
- Leroy, F., de Vuyst, L., 1999. The presence of salt and a curing agent reduces bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CTC 494, a potential starter culture for sausage fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5350–5356.
- Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., Gordon, J.I., 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022–1023.
- Liang, S., Zou, C., Lin, Y., Zhang, X., Ye, Y., 2013. Identification and characterization of P GCW14: a novel, strong constitutive promoter of *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* 35, 1865–1871.
- Li, L., Wang, J.-X., Zhao, X.-F., Kang, C.-J., Liu, N., Xiang, J.-H., Li, F.-H., Sueda, S., Kondo, H., 2005. High level expression, purification, and characterization of the shrimp antimicrobial peptide, Ch-penaeidin, in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 39, 144–151.
- Lima, J.R., Ribon, A. de O.B., Russell, J.B., Mantovani, H.C., 2009. Bovicin HC5 inhibits wasteful amino acid degradation by mixed ruminal bacteria in vitro. *FEMS Microbiol. Lett.* 292, 78–84.
- Li, P., Anumanthan, A., Gao, X.-G., Ilangovan, K., Suzara, V.V., Düzgüneş, N., Renugopalakrishnan, V., 2007. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 142, 105–124.
- Lin, K., Kuang, Y., Joseph, J.S., Kolatkar, P.R., 2002. Conserved codon composition of ribosomal protein coding genes in *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Saccharomyces cerevisiae*: lessons from supervised machine learning in functional genomics. *Nucleic Acids Res.* 30, 2599–2607.
- Line, J.E., Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Pereygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Levchuk, V.P., Svetoch, O.E., Seal, B.S., Siragusa, G.R., Stern, N.J., 2008. Isolation and

- purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 1094–1100.
- Lipkin, W.I., 2013. The changing face of pathogen discovery and surveillance. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 133–141.
- Liu, Z., Ma, P., Holtmark, I., Skaugen, M., Eijssink, V.G.H., Brurberg, M.B., 2013. New type of antimicrobial protein produced by the plant pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5721–5727.
- Logares, R., Sunagawa, S., Salazar, G., Cornejo-Castillo, F.M., Ferrera, I., Sarmiento, H., Hingamp, P., Ogata, H., de Vargas, C., Lima-Mendez, G., Raes, J., Poulain, J., Jaillon, O., Wincker, P., Kandels-Lewis, S., Karsenti, E., Bork, P., Acinas, S.G., 2014. Metagenomic 16S rDNA Illumina tags are a powerful alternative to amplicon sequencing to explore diversity and structure of microbial communities. *Environ. Microbiol.* 16, 2659–2671.
- Lohans, C.T., Vederas, J.C., Lohans, C.T., Vederas, J.C., 2011. Development of class IIa bacteriocins as therapeutic agents, development of class IIa bacteriocins as therapeutic agents. *Int. J. of Microbiol.*, 2012, e386410.
- Lohans, C.T., Huang, Z., van Belkum, M.J., Giroud, M., Sit, C.S., Steels, E.M., Zheng, J., Whittall, R.M., McMullen, L.M., Vederas, J.C., 2012. Structural characterization of the highly cyclized lantibiotic paenicitin A via a partial desulfurization/reduction strategy. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 19540–19543.
- Lohans, C.T., van Belkum, M.J., Li, J., Vederas, J.C., 2014. Characterization of bacterial antimicrobial peptides active against *Campylobacter jejuni*. *Can. J. Chem.* 93, 381–388.
- Loman, N.J., Misra, R.V., Dallman, T.J., Constantinidou, C., Gharbia, S.E., Wain, J., Pallen, M.J., 2012. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat. Biotech.* 30, 434–439.
- López-García, B., Moreno, A.B., San Segundo, B., De los Ríos, V., Manning, J.M., Gavilanes, J.G., Martínez-del-Pozo, A., 2010. Production of the biotechnologically relevant AFP from *Aspergillus giganteus* in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 70, 206–210.
- Lorca, G., L. Reddy, A. Nguyen, E. I. Sun, J. Tseng, M. R. Yen y M. H. Saier. 2010. Lactic acid bacteria: comparative genomic analyses of transport systems. En: “*Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*”, pp. 73-87, 1a edición. Mozzi, F., R. R. Raya y G. M. Vignolo (eds.). Wiley- Blackwell, Oxford, Reino Unido.
- Love, K.R., Politano, T.J., Panagiotou, V., Jiang, B., Stadheim, T.A., Love, J.C., 2012. Systematic single-cell analysis of *Pichia pastoris* reveals secretory capacity limits productivity. *PLoS ONE* 7, e37915.
- Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., Knight, R., 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489, 220–230.
- Lücke, F.K., 2000. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Sci.* 56, 105–115.
- Ludvigsen, J., Rangberg, A., Avershina, E., Sekelja, M., Kreibich, C., Amdam, G., Rudi, K., 2015. Shifts in the midgut/pyloric microbiota composition within a honey bee apiary throughout a season. *Microbes Environ.* 30, 235–244.
- Lyhs, U., Korkeala, H., Vandamme, P., Björkroth, J., 2001. *Lactobacillus alimentarius*: a specific spoilage organism in marinated herring. *Int. J. Food Microbiol.* 64, 355–360.
- Lyhs, U., Björkroth, J.K., 2008. *Lactobacillus sakei/curvatus* is the prevailing lactic acid

- bacterium group in spoiled maatjes herring. *Food Microbiol.* 25, 529–533.
- Malmström, J., Lee, H., Aebersold, R., 2007. Advances in proteomic workflows for systems biology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 378–384.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M.L., McNeil, B., Harvey, L.M., 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22, 249–270.
- Magurran, A.E., 2005. Biological diversity. *Curr. Biol.* 15, R116–118.
- Makrides, S.C., 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 60, 512–538.
- Mao, R., Teng, D., Wang, X., Zhang, Y., Jiao, J., Cao, X., Wang, J., 2015. Optimization of expression conditions for a novel NZ2114-derived antimicrobial peptide-MP1102 under the control of the GAP promoter in *Pichia pastoris* X-33. *BMC Microbiol.* 15, 57.
- Maqueda, M., Sánchez-Hidalgo, M., Fernández, M., Montalbán-López, M., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., 2008. Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 2–22.
- March, C., Manclús, J.J., Abad, A., Navarro, A., Montoya, A., 2005. Rapid detection and counting of viable beer-spoilage lactic acid bacteria using a monoclonal chemiluminescence enzyme immunoassay and a CCD camera. *J. Immunol. Methods* 303, 92–104.
- Marchesi, J.R., Adams, D.H., Fava, F., Hermes, G.D.A., Hirschfield, G.M., Hold, G., Quraishi, M.N., Kinross, J., Smidt, H., Tuohy, K.M., Thomas, L.V., Zoetendal, E.G., Hart, A., 2015. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut* 65(2):330-9.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y.-J., Chen, Z., Dewell, S.B., Du, L., Fierro, J.M., Gomes, X.V., Godwin, B.C., He, W., Helgesen, S., Ho, C.H., Ho, C.H., Irzyk, G.P., Jando, S.C., Alenquer, M.L.I., Jarvie, T.P., Jirage, K.B., Kim, J.-B., Knight, J.R., Lanza, J.R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei, M., Li, J., Lohman, K.L., Lu, H., Makhijani, V.B., McDade, K.E., McKenna, M.P., Myers, E.W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, M.T., Roth, G.T., Sarkis, G.J., Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K.A., Volkmer, G.A., Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M.P., Yu, P., Begley, R.F., Rothberg, J.M., 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437, 376–380.
- Marin, C., Palomeque, M.-D., Marco-Jiménez, F., Vega, S., 2014. Wild griffon vultures (*Gyps fulvus*) as a source of *Salmonella* and *Campylobacter* in Eastern Spain. *PLOS ONE* 9, e94191.
- Martin, E., Ganz, T., Lehrer, R.I., 1995. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. *J. Leukoc. Biol.* 58, 128–136.
- Martín, M., Gutiérrez, J., Criado, R., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2007. Chimeras of mature pediocin PA-1 fused to the signal peptide of enterocin P permits the cloning, production, and expression of pediocin PA-1 in *Lactococcus lactis*. *J. Food Prot.* 70, 2792–2798.
- Martín, M., Gutiérrez, J., Criado, R., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2006. Genes encoding bacteriocins and their expression and potential virulence factors of enterococci isolated from wood pigeons (*Columba palumbus*). *J. Food Prot.* 69, 520–531.

- Martínez, B., Rodríguez, A., Suárez, J.E., 2000. Lactococcin 972, a bacteriocin that inhibits septum formation in lactococci. *Microbiology* 146 ( Pt 4), 949–955.
- Martínez, B., Böttiger, T., Schneider, T., Rodríguez, A., Sahl, H.-G., Wiedemann, I., 2008. Specific interaction of the unmodified bacteriocin Lactococcin 972 with the cell wall precursor lipid II. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4666–4670.
- Martínez-Cuesta, M.C., Kok, J., Herranz, E., Peláez, C., Requena, T., Buist, G., 2000. Requirement of autolytic activity for bacteriocin-induced lysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3174–3179.
- Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, A., Lacadena, J., Mancheño, J.M., Oñaderra, M., López-otín, C., Gavilanes, J.G., 1998. Secretion of recombinant pro- and mature fungal alpha-sarcin ribotoxin by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: the Lys-Arg motif is required for maturation. *Protein Expr. Purif.* 12, 315–322.
- Martin, N.I., Breukink, E., 2007. Expanding role of lipid II as a target for lantibiotics. *Future Microbiol.* 2, 513–525.
- Martín-Platero, A.M., Valdivia, E., Ruíz-Rodríguez, M., Soler, J.J., Martín-Vivaldi, M., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., 2006. Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4245–4249.
- Masser, D.R., Stanford, D.R., Freeman, W.M., 2015. Targeted DNA methylation analysis by next-generation sequencing. *J. Vis. Exp.*
- Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N., Miyajima, K., 1996. An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry* 35, 11361–11368.
- Matsuzaki, K., 1998. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1376, 391–400.
- Mattanovich, D., Branduardi, P., Dato, L., Gasser, B., Sauer, M., Porro, D., 2012. Recombinant protein production in yeasts. *Methods Mol. Biol.* 824, 329–358.
- Mazzotta, A.S., Montville, T.J., 1997. Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10 degrees C and 30 degrees C. *J. Appl. Microbiol.* 82, 32–38.
- McEwen, S.A., Fedorka-Cray, P.J., 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin. Infect. Dis.* 34, S93–S106.
- Medvedev, P., Stanciu, M., Brudno, M., 2009. Computational methods for discovering structural variation with next-generation sequencing. *Nat. Methods* 6, S13–20.
- Mehla, J., Sood, S.K., 2011. Substantiation in *Enterococcus faecalis* of dose-dependent resistance and cross-resistance to pore-forming antimicrobial peptides by use of a polydiacetylene-based colorimetric assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 786–793.
- Menendez, J., Valdes, I., Cabrera, N., 2003. The ICL1 gene of *Pichia pastoris*, transcriptional regulation and use of its promoter. *Yeast* 20, 1097–1108.
- Mercer, T.R., Gerhardt, D.J., Dinger, M.E., Crawford, J., Trapnell, C., Jeddelloh, J.A., Mattick, J.S., Rinn, J.L., 2012. Targeted RNA sequencing reveals the deep complexity of the human transcriptome. *Nat. Biotechnol.* 30, 99–104.
- Metzker, M.L., 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Rev. Genet.* 11, 31–46.

- Michel-Briand, Y., Baysse, C., 2002a. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 84, 499–510.
- Michel-Briand, Y., Baysse, C., 2002b. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 84, 499–510.
- Mikhail, S., Faltas, B., Salem, M.E., Bekaii-Saab, T., 2016. Application of next-generation sequencing in gastrointestinal and liver tumors. *Cancer Letters* 374, 187–191.
- Mills, S., Stanton, C., Hill, C., Ross, R.P., 2011. New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. *Annu. Rev. Food. Sci. Technol.* 2, 299–329.
- Mills, J.D., Kawahara, Y., Janitz, M., 2013. Strand-Specific RNA-Seq Provides Greater Resolution of transcriptome profiling. *Curr. Genomics* 14, 173–181.
- Ming, X., Daeschel, M.A., 1993. Nisin resistance of foodborne bacteria and the specific resistance responses of *Listeria monocytogenes*. *Scott A. J. Food Protect.* 56, 944–948.
- Miteva, M., Andersson, M., Karshikoff, A., Otting, G., 1999. Molecular electroporation: a unifying concept for the description of membrane pore formation by antibacterial peptides, exemplified with NK-lysin. *FEBS Lett.* 462, 155–158.
- Moll, G.N., Konings, W.N., Driessen, A.J., 1999. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76, 185–198.
- Montville, T.J., Bruno, M.E., 1994. Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. *Int. J. Food Microbiol.* 24, 53–74.
- Moore, A.J., Beazley, W.D., Bibby, M.C., Devine, D.A., 1996. Antimicrobial activity of cecropins. *J. Antimicrob. Chemother.* 37, 1077–1089.
- Mori, H., Ito, K., 2001. The Sec protein-translocation pathway. *Trends Microbiol.* 9, 494–500.
- Morton, C.O., Hayes, A., Wilson, M., Rash, B.M., Oliver, S.G., Coote, P., 2007. Global phenotype screening and transcript analysis outlines the inhibitory mode(s) of action of two amphibian-derived, alpha-helical, cationic peptides on *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3948–3959.
- Müller, A., Ulm, H., Reder-Christ, K., Sahl, H.-G., Schneider, T., 2012. Interaction of type A lantibiotics with undecaprenol-bound cell envelope precursors. *Microb. Drug Resist.* 18, 261–270.
- Münch, D., Müller, A., Schneider, T., Kohl, B., Wenzel, M., Bandow, J.E., Maffioli, S., Sosio, M., Donadio, S., Wimmer, R., Sahl, H.-G., 2014. The lantibiotic NAI-107 binds to bactoprenol-bound cell wall precursors and impairs membrane functions. *J. Biol. Chem.* 289, 12063–12076.
- Muñoz-Atienza, E., Gómez-Sala, B., Araújo, C., Campanero, C., del Campo, R., Hernández, P.E., Herranz, C., Cintas, L.M., 2013. Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of lactic acid bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiol.* 13, 15.
- Mygind, P.H., Fischer, R.L., Schnorr, K.M., Hansen, M.T., Sönksen, C.P., Ludvigsen, S., Raventós, D., Buskov, S., Christensen, B., De Maria, L., Taboureau, O., Yaver, D., Elvig-Jørgensen, S.G., Sørensen, M.V., Christensen, B.E., Kjaerulff, S., Frimodt-Møller, N., Lehrer, R.I., Zasloff, M., Kristensen, H.-H., 2005. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature* 437, 975–980.
- Nagpal, R., Kumar, A., Kumar, M., Behare, P.V., Jain, S., Yadav, H., 2012. Probiotics, their

- health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS Microbiol. Lett.* 334, 1–15.
- Nandiwada, L.S., Schamberger, G.P., Schafer, H.W., Diez-Gonzalez, F., 2004. Characterization of an E2-type colicin and its application to treat alfalfa seeds to reduce *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J. Food Microbiol.* 93, 267–279.
- Natale, P., Brüser, T., Driessen, A.J.M., 2008. Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 1735–1756.
- Naumov, G.I., 2015. The yeast *Komagataella*: A genetic genus in accordance with interspecies hybridization. *Microbiology* 84, 538–543.
- Navin, N., Kendall, J., Troge, J., Andrews, P., Rodgers, L., McIndoo, J., Cook, K., Stepansky, A., Levy, D., Esposito, D., Muthuswamy, L., Krasnitz, A., McCombie, W.R., Hicks, J., Wigler, M., 2011. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* 472, 90–94. doi:10.1038/nature09807.
- Ndaw, A., Zinedine, A., Faid, M., Bouseta, A., 2008. Effect of controlled lactic acid bacterial fermentation on the microbiological and chemical qualities of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*). *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 55, 295–310.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Håvarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V., Holo, H., 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70, 113–128.
- Nes, I.F., Holo, H., 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers* 55, 50–61.
- Nes, I. F., H. Holo, G. Fimland, H. H. Hauge y J. Nissen-Meyer., 2002. Unmodified peptide-bacteriocins (class II) produced by lactic acid bacteria., in: Peptide Antibiotics. Discovery, Modes of Action, and Applications. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, EE. UU., pp. 81–115.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Holo, H., 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* 189, 1189–1198.
- Nes, I. F., M. Kjos y D. B. Diep., 2012. Antimicrobial components of lactic acid bacteria, in: Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE. UU., pp. 285–329.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Ike, Y., 2014. Enterococcal bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to niche control, in: Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N. (Eds.), Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston.
- Ni, Z., Zhou, X., Sun, X., Wang, Y., Zhang, Y., 2008. Decrease of hirudin degradation by deleting the KEX1 gene in recombinant *Pichia pastoris*. *Yeast Chichester Engl.* 25, 1–8.
- Nieto Lozano, J.C., Meyer, J.N., Sletten, K., Peláz, C., Nes, I.F., 1992. Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Gen. Microbiol.* 138, 1985–1990.
- Nilsen, T., Nes, I.F., Holo, H., 2003. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2975–2984.
- Nishie, M., Nagao, J.-I., Sonomoto, K., 2012. Antibacterial peptides “bacteriocins”: an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol. Sci.* 17, 1–16.



- Nissen-Meyer, J., Rogne, P., Oppegård, C., Haugen, H.S., Kristiansen, P.E., 2009. Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10, 19–37.
- Nissen-Meyer, J., Oppegård, C., Rogne, P., Haugen, H.S., Kristiansen, P.E., 2010. Structure and mode-of-action of the two-peptide (Class-IIb) bacteriocins. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 2, 52–60.
- Nizet, V., Ohtake, T., Lauth, X., Trowbridge, J., Rudisill, J., Dorschner, R.A., Pestonjamas, V., Piraino, J., Huttner, K., Gallo, R.L., 2001. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* 414, 454–457.
- Öberg, F., Sjöhamn, J., Conner, M.T., Bill, R.M., Hedfalk, K., 2011. Improving recombinant eukaryotic membrane protein yields in *Pichia pastoris*: the importance of codon optimization and clone selection. *Mol. Membr. Biol.* 28, 398–411.
- O'Connor, E.B., O'Riordan, B., Morgan, S.M., Whelton, H., O'Mullane, D.M., Ross, R.P., Hill, C., 2006. A lacticin 3147 enriched food ingredient reduces *Streptococcus mutans* isolated from the human oral cavity in saliva. *J. Appl. Microbiol.* 100, 1251–1260. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02856.x.
- Ogier, J.-C., Casalta, E., Farrokh, C., Saihi, A., 2008a. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Leuconostoc* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 286–290.
- Ogier, J.-C., Serror, P., 2008b. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 291–301.
- Ojcius, D.M., Young, J.D., 1991. Cytolytic pore-forming proteins and peptides: is there a common structural motif? *Trends Biochem. Sci.* 16, 225–229.
- O Levy, J.W., 1993. Antibacterial 15-kDa protein isoforms (p15s) are members of a novel family of leukocyte proteins. *J. Biol. Chem.* 268: 6058–6063.
- Omar, N.B., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N.M.K., Franz, C.M.A.P., Holzappel, W.H., Rubén, P.-P., Martínez-Canámero, M., Gálvez, A., 2004. Functional and safety aspects of Enterococci isolated from different Spanish foods. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 118–130.
- Ooi, C.E., Weiss, J., Levy, O., Elsbach, P., 1990. Isolation of two isoforms of a novel 15-kDa protein from rabbit polymorphonuclear leukocytes that modulate the antibacterial actions of other leukocyte proteins. *J. Biol. Chem.* 265, 15956–15962.
- Oppegård, C., Rogne, P., Emanuelsen, L., Kristiansen, P.E., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., 2007. The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13, 210–219.
- Oppenheim, J., Biragyn, A., Kwak, L., Yang, D., 2003. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann. Rheum. Dis.* 62, ii17–ii21.
- O'Sullivan, L., Ross, R.P., Hill, C., 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84, 593–604.
- Ovchinnikov, K.V., Kristiansen, P.E., Uzelac, G., Topisirovic, L., Kojic, M., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Diep, D.B., 2014. Defining the structure and receptor binding domain of the leaderless bacteriocin LsbB. *J. Biol. Chem.* 289, 23838–23845.
- Pag, U., Sahl, H.-G., 2002. Multiple activities in lantibiotics--models for the design of novel antibiotics? *Curr. Pharm. Des.* 8, 815–833.
- Panavas, T., Sanders, C., Butt, T., 2009. SUMO Fusion technology for enhanced protein

- production in prokaryotic and eukaryotic expression systems, in: Ulrich, H. (Ed.), SUMO Protocols, METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY™. Humana Press, pp. 303–317.
- Panyutich, A., Shi, J., Boutz, P.L., Zhao, C., Ganz, T., 1997. Porcine polymorphonuclear leukocytes generate extracellular microbicidal activity by elastase-mediated activation of secreted propeptidases. *Infect. Immun.* 65, 978–985.
- Papagianni, M., 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol. Adv.* 21, 465–499.
- Parachin, N.S., Mulder, K.C., Viana, A.A., Dias, S.C., Franco, O.L., 2012. Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. *Peptides* 38(2):446–56.
- Park, C.B., Yi, K.S., Matsuzaki, K., Kim, M.S., Kim, S.C., 2000. Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 8245–8250.
- Park, P.J., 2009. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nat. Rev. Genet.* 10, 669–680.
- Patterson, E., Ryan, P.M., Cryan, J.F., Dinan, T.G., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., 2016. Gut microbiota, obesity and diabetes. *Postgrad Med J.*
- Patrzykat, A., Gallant, J.W., Seo, J.-K., Pytyck, J., Douglas, S.E., 2003. Novel antimicrobial peptides derived from flatfish genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2464–2470.
- Peng, H., Yang, M., Huang, W.-S., Ding, J., Qu, H.-D., Cai, J.-J., Zhang, N., Wang, K.-J., 2010. Soluble expression and purification of a crab antimicrobial peptide scygonadin in different expression plasmids and analysis of its antimicrobial activity. *Protein Expr. Purif.* 70, 109–115.
- Peng, H., Liu, H.-P., Chen, B., Hao, H., Wang, K.-J., 2012. Optimized production of scygonadin in *Pichia pastoris* and analysis of its antimicrobial and antiviral activities. *Protein Expr. Purif.* 82, 37–44.
- Perez Espitia, P.J., de Fátima Ferreira Soares, N., dos Reis Coimbra, J.S., de Andrade, N.J., Souza Cruz, R., Alves Medeiros, E.A., 2012. Bioactive peptides: Synthesis, properties, and applications in the packaging and preservation of food. *Compr. Rev. Food Sci.* 11, 187–204. doi:10.1111/j.1541-4337.2011.00179.x
- Pham, H.T., Riu, K.Z., Jang, K.M., Cho, S.K., Cho, M., 2004. Bactericidal activity of glycinecin A, a bacteriocin derived from *Xanthomonas campestris* pv. glycines, on phytopathogenic *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4486–4490.
- Piper, C., Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C., 2009a. Discovery of medically significant lantibiotics. *Curr. Drug Discov. Technol.* 6, 1–18.
- Piper, C., Draper, L.A., Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C., 2009b. A comparison of the activities of lactacin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 546–551.
- Pokorny, A., Almeida, P.F.F., 2004. Kinetics of dye efflux and lipid flip-flop induced by delta-lysine in phosphatidylcholine vesicles and the mechanism of graded release by amphipathic, alpha-helical peptides. *Biochemistry* 43, 8846–8857.
- Pokusheva, K., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D., 2011. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes Nutr.* 6, 285–306. doi:10.1007/s12263-010-0206-6.
- Poland, J.A., Brown, P.J., Sorrells, M.E., Jannink, J.-L., 2012. Development of high-density

- genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *PLoS ONE* 7, e32253.
- Pons, A.M., Lanneluc, I., Cottenceau, G., Sable, S., 2002. New developments in non-post translationally modified microcins. *Biochimie* 84, 531–537.
- Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P., Shai, Y., 1992. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogs with phospholipid membranes. *Biochemistry* 31, 12416–12423.
- Prielhofer, R., Maurer, M., Klein, J., Wenger, J., Kiziak, C., Gasser, B., Mattanovich, D., 2013. Induction without methanol: novel regulated promoters enable high-level expression in *Pichia pastoris*. *Microb. Cell Fact.* 12, 5.
- Pugsley, A.P., 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57, 50–108.
- Pushkarev, D., Neff, N.F., Quake, S.R., 2009. Single-molecule sequencing of an individual human genome. *Nat. Biotechnol.* 27, 847–850.
- Quadri, L.E., Sailer, M., Terebiznik, M.R., Roy, K.L., Vederas, J.C., Stiles, M.E., 1995. Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of carnobacteriocins B2 and BM1. *J. Bacteriol.* 177, 1144–1151.
- Ramnath, M., Arous, S., Gravesen, A., Hastings, J.W., Héchard, Y., 2004. Expression of *mptC* of *Listeria monocytogenes* induces sensitivity to class IIa bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Microbiol. Read. Engl.* 150, 2663–2668.
- Ramanathan, B., Davis, P.E.J., Ross, C.R., Blecha, F., 2002. Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microbes Infect.* 4, 361–372.
- Ray, B., Schamber, R., Miller, K.W., 1999. The pediocin AcH precursor is biologically active. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2281–2286.
- Reddy, K.V.R., Aranha, C., Gupta, S.M., Yedery, R.D., 2004. Evaluation of antimicrobial peptide nisin as a safe vaginal contraceptive agent in rabbits: in vitro and in vivo studies. *Reproduction* 128, 117–126.
- Reed, W.A., Elzer, P.H., Enright, F.M., Jaynes, J.M., Morrey, J.D., White, K.L., 1997. Interleukin 2 promoter/enhancer controlled expression of a synthetic cecropin-class lytic peptide in transgenic mice and subsequent resistance to *Brucella abortus*. *Transgenic Res.* 6, 337–347.
- Rehm, H.L., 2013. Disease-targeted sequencing: a cornerstone in the clinic. *Nat. Rev. Genet.* 14, 295–300.
- Reizel, Y., Chapal-Ilani, N., Adar, R., Itzkovitz, S., Elbaz, J., Maruvka, Y.E., Segev, E., Shlush, L.I., Dekel, N., Shapiro, E., 2011. Colon stem cell and crypt dynamics exposed by cell lineage reconstruction. *PLoS Genet.* 7.
- Riboulet-Bisson, E., Sturme, M.H.J., Jeffery, I.B., O'Donnell, M.M., Neville, B.A., Forde, B.M., Claesson, M.J., Harris, H., Gardiner, G.E., Casey, P.G., Lawlor, P.G., O'Toole, P.W., Ross, R.P., 2012. Effect of *Lactobacillus salivarius* bacteriocin Abp118 on the mouse and pig intestinal microbiota. *PloS One* 7, e31113.
- Richard, C., Drider, D., Elmorjani, K., Marion, D., Prévost, H., 2004. Heterologous expression and purification of active divercin V41, a class IIa bacteriocin encoded by a synthetic gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186, 4276–4284.

- Richard, C., Cañon, R., Naghmouchi, K., Bertrand, D., Prévost, H., Drider, D., 2006. Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiol.* 23, 175–183.
- Richter, B.G., Sexton, D.P., 2009. Managing and analyzing next-generation sequence data. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000369.
- Riley, M.A., Wertz, J.E., 2002. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 117–137.
- Robles Alonso, V., Guarner, F., 2013. Linking the gut microbiota to human health. *Br. J. Nutr.* 109 Suppl 2, S21–26.
- Rodríguez-Ruano, S.M., Martín-Vivaldi, M., Martín-Platero, A.M., López-López, J.P., Peralta-Sánchez, J.M., Ruiz-Rodríguez, M., Soler, J.J., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., 2015. The hoopoe's uropygial gland hosts a bacterial community influenced by the living conditions of the bird. *PLoS ONE* 10.
- Roggenbuck, M., Schnell, I.B., Blom, N., Bælum, J., Bertelsen, M.F., Sicheritz-Pontén, T., Sørensen, S.J., Gilbert, M.T.P., Graves, G.R., Hansen, L.H., 2014. The microbiome of new world vultures. *Nat. Commun.* 5, 5498.
- Roh, E., Lee, S., Lee, Y., Ra, D., Choi, J., Moon, E., Heu, S., 2009. Diverse antibacterial activity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* isolated in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 42–50.
- Romanos, M.A., Scorer, C.A., Clare, J.J., 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 8, 423–488.
- Ross, R.P., Galvin, M., McAuliffe, O., Morgan, S.M., Ryan, M.P., Twomey, D.P., Meaney, W.J., Hill, C., 1999. Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76, 337–346.
- Ross, R.P., Morgan, S., Hill, C., 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79, 3–16.
- Ruiz-Garbajosa, P., Cantón, R., Pintado, V., Coque, T.M., Willems, R., Baquero, F., del Campo, R., 2006. Genetic and phenotypic differences among *Enterococcus faecalis* clones from intestinal colonisation and invasive disease. *Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12, 1193–1198.
- Ruiz-Rodríguez, M., Soler, J.J., Martín-Vivaldi, M., Martín-Platero, A.M., Méndez, M., Peralta-Sánchez, J.M., Ananou, S., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., 2014. Environmental factors shape the community of symbionts in the hoopoe uropygial gland more than genetic factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 6714–6723.
- Rusk, N., 2009. Cheap third-generation sequencing. *Nat. Meth.* 6, 244–244.
- Rusk, N., Kiermer, V., 2008. Primer: Sequencing--the next generation. *Nat. Methods* 5, 15.
- Ryan, M. P., C. Hill y R. P. Ross. 2002. Exploitation of lantibiotic peptides for food and medical uses. En: *Peptide antibiotics. Discovery, modes of action, and applications*, pp. 193-242. Dutton, C. J., M. A. Haxell, H. A. I. McArthur y R. G. Wax (eds.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Rydlo, T., Miltz, J., Mor, A., 2006. Eukaryotic antimicrobial peptides: promises and premises in food safety. *J. Food Sci.* 71, R125–R135.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., Mattila-Sandholm, T., 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84, 197–215.

- Saavedra, L., Minahk, C., de Ruiz Holgado, A.P., Sesma, F., 2004. Enhancement of the enterocin CRL35 activity by a synthetic peptide derived from the NH<sub>2</sub>-terminal Sequence. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2778–2781.
- Sablon, E., Contreras, B., Vandamme, E., 2000. Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 68, 21–60.
- Sakamoto, K., Konings, W.N., 2003. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int. J. Food Microbiol.* 89, 105–124.
- Salminen, S., Isolauri, E., Salminen, E., 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70, 347–358.
- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W.M., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E., Mattila-Sandholm, T., 1998. Demonstration of safety of probiotics - a review. *Int. J. Food Microbiol.* 44, 93–106.
- Salminen, S., A. von Wright, 2012. Probiotics: safety and efficacy, en: *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds), CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU., pp. 509–524.
- Salvucci, E., Saavedra, L., Hebert, E.M., Haro, C., Sesma, F., 2012. Enterocin CRL35 inhibits *Listeria monocytogenes* in a murine model. *Foodborne Pathog. Dis.* 9, 68–74.
- Sánchez, J., Basanta, A., Gómez-Sala, B., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2007a. Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int. J. Food Microbiol.* 117, 295–305.
- Sánchez, J., Basanta, A., Gómez-Sala, B., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2007b. Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int. J. Food Microbiol.* 117, 295–305.
- Sánchez, J., Borrero, J., Gómez-Sala, B., Basanta, A., Herranz, C., Cintas, L.M., Hernández, P.E., 2008. Cloning and heterologous production of hiracin JM79, a Sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, in lactic acid bacteria and *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2471–2479.
- Sanders, M.E., Akkermans, L.M.A., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J., Hörmannspurger, G., Huys, G., Levy, D.D., Lutgendorff, F., Mack, D., Phothirath, P., Solano-Aguilar, G., Vaughan, E., 2010. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes* 1, 164–185.
- Sarkar, S., 2013. Probiotics as functional foods: documented health benefits. *J. Nutr. Food Sci.* 43, 107–115.
- Saunders, C.J., Miller, N.A., Soden, S.E., Dinwiddie, D.L., Noll, A., Alnadi, N.A., Andraws, N., Patterson, M.L., Krivohlavek, L.A., Fellis, J., Humphray, S., Saffrey, P., Kingsbury, Z., Weir, J.C., Betley, J., Grocock, R.J., Margulies, E.H., Farrow, P. E.J., Artman, M., Safina, N.P., Petrikin, J.E., Hall, K.P., Kingsmore, S.F., 2012. Rapid whole-genome sequencing for genetic disease diagnosis in neonatal intensive care units. *Sci. Transl. Med.* 4, 154ra135.
- Schadt, E.E., Turner, S., Kasarskis, A., 2010. A window into third-generation sequencing.

- Hum. Mol. Genet.* 19, R227–240.
- Schmidt, J.W., Greenough, A., Burns, M., Luteran, A.E., McCafferty, D.G., 2010. Generation of ramoplanin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 310, 104–111.
- Schoeman, H., Vivier, M.A., Du Toit, M., Dicks, L.M., Pretorius, I.S., 1999. The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (pedA) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15, 647–656.
- Scocchi, M., Skerlavaj, B., Romeo, D., Gennaro, R., 1992. Proteolytic cleavage by neutrophil elastase converts inactive storage proforms to antibacterial bactenecins. *Eur. J. Biochem.* 209, 589–595.
- Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C.M., Finlay, B.B., 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* 90, 859–904.
- Selsted, M.E., Ouellette, A.J., 2005. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat. Immunol.* 6, 551–557.
- SEO/BirdLife, 2008. El buitre leonado en España. Población reproductora en 2008 y método de censo.
- Serrano, A., 2001. Estudio de la producción heteróloga de una lipasa del hongo *Rhizopus oryzae* en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, España.
- Shaikh, F., Abhinand, P., Ragunath, P., 2012. Identification and characterization of *Lactobacillus salavarius* bacteriocins and its relevance in cancer therapeutics. *Bioinformation* 8, 589–594.
- Shalek, A.K., Satija, R., Shuga, J., Trombetta, J.J., Gennert, D., Lu, D., Chen, P., Gertner, R.S., Gaublomme, J.T., Yosef, N., Schwartz, S., Fowler, B., Weaver, S., Wang, J., Wang, X., Ding, R., Raychowdhury, R., Friedman, N., Hacohen, N., Park, H., May, A.P., Regev, A., 2014. Single-cell RNA-seq reveals dynamic paracrine control of cellular variation. *Nature* 510, 363–369.
- Shendure, J., Porreca, G.J., Reppas, N.B., Lin, X., McCutcheon, J.P., Rosenbaum, A.M., Wang, M.D., Zhang, K., Mitra, R.D., Church, G.M., 2005. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science* 309, 1728–1732.
- Shen, S., Sulter, G., Jeffries, T.W., Cregg, J.M., 1998. A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 216, 93–102.
- Shen, T., Pajaro-Van de Stadt, S.H., Yeat, N.C., Lin, J.C.-H., 2015. Clinical applications of next generation sequencing in cancer: from panels, to exomes, to genomes. *Front. Genet.* 6.
- Shi, J., Ganz, T., 1998. The role of protegrins and other elastase-activated polypeptides in the bactericidal properties of porcine inflammatory fluids. *Infect. Immun.* 66, 3611–3617.
- Shin, S.Y., Kang, S.W., Lee, D.G., Eom, S.H., Song, W.K., Kim, J.I., 2000. CRAMP analogues having potent antibiotic activity against bacterial, fungal, and tumor cells without hemolytic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 904–909.
- Siegel, T.N., Hon, C.-C., Zhang, Q., Lopez-Rubio, J.-J., Scheidig-Benatar, C., Martins, R.M., Sismeiro, O., Coppée, J.-Y., Scherf, A., 2014. Strand-specific RNA-Seq reveals widespread and developmentally regulated transcription of natural antisense transcripts in *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics* 15, 150.

- Silkin, L., Hamza, S., Kaufman, S., Cobb, S.L., Vederas, J.C., 2008. Spermicidal bacteriocins: lactacin 3147 and subtilosin A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 3103–3106.
- Silla Santos, M.H., 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 213–231.
- Sit, C.S., Lohans, C.T., van Belkum, M.J., Campbell, C.D., Miskolzie, M., Vederas, J.C., 2012. Substitution of a conserved disulfide in the type IIa bacteriocin, leucocin A, with L-leucine and L-serine residues: effects on activity and three-dimensional structure. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 13, 35–38.
- Skaugen, M., L. M. Cintas, and I. F. Nes, 2003. Genetics of bacteriocin production in lactic acid bacteria, en: Genetics of lactic acid bacteria. *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, New York, NY, USA., pp. 225–260.
- Skerlavaj, B., Benincasa, M., Risso, A., Zanetti, M., Gennaro, R., 1999. SMAP-29: a potent antibacterial and antifungal peptide from sheep leukocytes. *FEBS Lett.* 463, 58–62.
- Song, X., Wang, J., Wu, F., Li, X., Teng, M., Gong, W., 2005. cDNA cloning, functional expression and antifungal activities of a dimeric plant defensin SPE10 from *Pachyrrhizus erosus* seeds. *Plant. Mol. Biol.* 57, 13–20.
- Sørensen, O.E., Follin, P., Johnsen, A.H., Calafat, J., Tjabringa, G.S., Hiemstra, P.S., Borregaard, N., 2001. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* 97, 3951–3959.
- Sprules, T., Kawulka, K.E., Gibbs, A.C., Wishart, D.S., Vederas, J.C., 2004. NMR solution structure of the precursor for carnobacteriocin B2, an antimicrobial peptide from *Carnobacterium piscicola*. *Eur. J. Biochem.* 271, 1748–1756.
- Stadlmayr, G., Mecklenbräuker, A., Rothmüller, M., Maurer, M., Sauer, M., Mattanovich, D., Gasser, B., 2010. Identification and characterisation of novel *Pichia pastoris* promoters for heterologous protein production. *J. Biotechnol.* 150, 519–529.
- Stein, L.D., 2010. The case for cloud computing in genome informatics. *Genome Biol.* 11, 207.
- Stern, N.J., Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Pokhilenko, V.D., Levchuk, V.P., Svetoch, O.E., Seal, B.S., 2006. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3111–3116.
- Stiles, M.E., Holzapfel, W.H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 1–29.
- Stolz, A., Wolf, D.H., 2010. Endoplasmic reticulum associated protein degradation: a chaperone assisted journey to hell. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 694–705.
- Suzzi, G., Gardini, F., 2003. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 41–54.
- Svetoch, E.A., Stern, N.J., Eruslanov, B.V., Kovalev, Y.N., Volodina, L.I., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Pokhilenko, V.D., Borzenkov, V.N., Levchuk, V.P., Svetoch, O.E., Kudriavtseva, T.Y., 2005. Isolation of *Bacillus circulans* and *Paenibacillus polymyxa* strains inhibitory to *Campylobacter jejuni* and characterization of associated bacteriocins. *J. Food Prot.* 68, 11–17.
- Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Borzenkov, V.N., Levchuk, V.P., Svetoch, O.E., Kovalev, Y.N., Stepanshin, Y.G., Siragusa, G.R.,

- Seal, B.S., Stern, N.J., 2008. Diverse Antimicrobial Killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 Bacteriocin. *J. Agric. Food Chem.* 56, 1942–1948.
- Swe, P.M., Heng, N.C.K., Ting, Y.-T., Baird, H.J., Carne, A., Tauch, A., Tagg, J.R., Jack, R.W., 2007. ef1097 and ypkK encode enterococcin V583 and corynicin JK, members of a new family of antimicrobial proteins (bacteriocins) with modular structure from Gram-positive bacteria. *Microbiology* 153, 3218–3227.
- Syvitski, R.T., Burton, I., Mattatall, N.R., Douglas, S.E., Jakeman, D.L., 2005. Structural characterization of the antimicrobial peptide pleurocidin from winter flounder. *Biochemistry* 44, 7282–7293.
- Tagg, J.R., 2004. Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-*Streptococcus pyogenes* bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. *Indian J. Med. Res.* 119 Suppl, 13–16.
- Tam, J.P., Wang, S., Wong, K.H., Tan, W.L., 2015. Antimicrobial peptides from plants. *Pharm. Basel Switz.* 8, 711–757.
- Tanaka, S., Yamamoto, K., Yamada, K., Furuya, K., Uyeno, Y., 2016. Relationship of enhanced butyrate production by colonic butyrate-producing bacteria to immunomodulatory effects in normal mice fed an insoluble fraction of *Brassica rapa* l. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 2693–2699.
- Tang, X.-S., Tang, Z.-R., Wang, S.-P., Feng, Z.-M., Zhou, D., Li, T.-J., Yin, Y.-L., 2012. Expression, purification, and antibacterial activity of bovine lactoferrampin-lactoferricin in *Pichia pastoris*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166, 640–651.
- ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M., Huis in 't Veld, J.H., 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 11, 73–84.
- Terpe, K., 2003. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 523–533.
- Thomas, T., Gilbert, J., Meyer, F., 2012. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microb. Inform. Exp.* 2, 3.
- Tims, S., Derom, C., Jonkers, D.M., Vlietinck, R., Saris, W.H., Kleerebezem, M., de Vos, W.M., Zoetendal, E.G., 2013. Microbiota conservation and BMI signatures in adult monozygotic twins. *ISME J.* 7, 707–717.
- Tiwari, S.K., Sutyak Noll, K., Cavera, V.L., Chikindas, M.L., 2015. Improved antimicrobial activities of synthetic-hybrid bacteriocins designed from enterocin E50-52 and pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1661–1667.
- Todorov, S.D., Dicks, L.M.T., 2005. Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. *J. Basic Microbiol.* 45, 312–322.
- Todorov, S.D., Wachsmann, M.B., Knoetze, H., Meincken, M., Dicks, L.M.T., 2005. An antibacterial and antiviral peptide produced by *Enterococcus mundtii* ST4V isolated from soya beans. *Int. J. Antimicrob. Agents* 25, 508–513.
- Trautner, B.W., Hull, R.A., Darouiche, R.O., 2005. Colicins prevent colonization of urinary catheters. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 413–415.
- Travis, S.M., Anderson, N.N., Forsyth, W.R., Espiritu, C., Conway, B.D., Greenberg, E.P., McCray, P.B., Lehrer, R.I., Welsh, M.J., Tack, B.F., 2000. Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides. *Infect. Immun.* 68, 2748–2755.
- Tripathi, S., Wang, G., White, M., Qi, L., Taubenberger, J., Hartshorn, K.L., 2015. Antiviral



- activity of the human cathelicidin, LL-37, and derived peptides on seasonal and pandemic influenza A viruses. *PLoS ONE* 10, e0124706.
- Tsai, P.-W., Yang, C.-Y., Chang, H.-T., Lan, C.-Y., 2011. Human antimicrobial peptide LL-37 inhibits adhesion of *Candida albicans* by interacting with yeast cell-wall carbohydrates. *PLoS ONE* 6, e17755.
- Tschopp, J.F., Brust, P.F., Cregg, J.M., Stillman, C.A., Gingeras, T.R., 1987. Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res.* 15, 3859–3876
- Turroni, F., van Sinderen, D., Ventura, M., 2011. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *Int. J. Food Microbiol.* 149, 37–44.
- Twomey, D., Ross, R.P., Ryan, M., Meaney, B., Hill, C., 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 165–185.
- Työppönen, S., Petäjä, E., Mattila-Sandholm, T., 2003. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 83, 233–244.
- Uteng, M., Hauge, H.H., Markwick, P.R.L., Fimland, G., Mantzilas, D., Nissen-Meyer, J., Muhle-Goll, C., 2003. Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P and a sakacin P variant that is structurally stabilized by an inserted C-terminal disulfide bridge. *Biochemistry* 42, 11417–11426.
- Utturkar, S.M., Klingeman, D.M., Land, M.L., Schadt, C.W., Doktycz, M.J., Pelletier, D.A., Brown, S.D., 2014. Evaluation and validation of de novo and hybrid assembly techniques to derive high-quality genome sequences. *Bioinformatics* 30, 2709–2716.
- Uzelac, G., Kojic, M., Lozo, J., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Gabrielsen, C., Kristensen, T., Nes, I.F., Diep, D.B., Topisirovic, L., 2013. A Zn-dependent metallopeptidase is responsible for sensitivity to LsbB, a class II leaderless bacteriocin of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5. *J. Bacteriol.* 195, 5614–5621.
- Vadyvaloo, V., Hastings, J.W., van der Merwe, M.J., Rautenbach, M., 2002. Membranes of class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* cells contain increased levels of desaturated and short-acyl-chain phosphatidylglycerols. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5223–5230.
- Vadyvaloo, V., Snoep, J.L., Hastings, J.W., Rautenbach, M., 2004. Physiological implications of class IIa bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiology* 150, 335–340.
- van den Berg, J.A., van der Laken, K.J., van Ooyen, A.J., Renniers, T.C., Rietveld, K., Schaap, A., Brake, A.J., Bishop, R.J., Schultz, K., Moyer, D., 1990. *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Biotechnology* 8, 135–139.
- van Dijk, E.L., Chen, C.L., d'Aubenton-Carafa, Y., Gourvennec, S., Kwapisz, M., Roche, V., Bertrand, C., Silvain, M., Legoux-Né, P., Loeillet, S., Nicolas, A., Thermes, C., Morillon, A., 2011. XUTs are a class of Xrn1-sensitive antisense regulatory non-coding RNA in yeast. *Nature* 475, 114–117.
- van Heel, A.J., de Jong, A., Montalbán-López, M., Kok, J., Kuipers, O.P., 2013. BAGEL3: automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-)bactericidal posttranslationally modified peptides. *Nucleic Acids Res.* 41, W448–W453.

- Van Tyne, D., Gilmore, M.S., 2014. Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* 68, 337–356.
- Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pilarski, F., 2015. Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 38, 417–428.
- van Ooyen, A.J.J., Dekker, P., Huang, M., Olsthoorn, M.M.A., Jacobs, D.I., Colussi, P.A., Taron, C.H., 2006. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res.* 6, 381–392.
- Van Reenen, C.A., Chikindas, M.L., Van Zyl, W.H., Dicks, L.M.T., 2003. Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 81, 29–40.
- van Roosmalen, M.L., Geukens, N., Jongbloed, J.D.H., Tjalsma, H., Dubois, J.-Y.F., Bron, S., van Dijk, J.M., Anné, J., 2004. Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1694, 279–297.
- van Wely, K.H., Swaving, J., Freudl, R., Driessen, A.J., 2001. Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 437–454.
- Vaughan, A., Rouse, S., Van Sinderen, D., 2004. Investigating the antimicrobial efficacy of a lactococcal bacteriocin for the development of microbiologically stable beer. *J. Inst. Brew.* 110, 181–188.
- Veenhuis, M., Van Dijken, J.P., Harder, W., 1983. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. *Adv. Microb. Physiol.* 24, 1–82.
- Vela, A.I., Casas-Díaz, E., Fernández-Garayzábal, J.F., Serrano, E., Agustí, S., Porrero, M.C., Sánchez del Rey, V., Marco, I., Lavín, S., Domínguez, L., 2015. Estimation of cultivable bacterial diversity in the cloacae and pharynx in Eurasian griffon vultures (*Gyps fulvus*). *Microb. Ecol.* 69, 597–607.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Debevere, J., 2004. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 96, 149–164.
- Voelkerding, K.V., Dames, S.A., Durtschi, J.D., 2009. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin. Chem.* 55, 641–658.
- Von Wright, A. y L. Axelsson. 2012. Lactic acid bacteria: an introduction. En: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects, pp. 1-16, 4a edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). *CRC Press*, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Wachsman, M.B., Farías, M.E., Takeda, E., Sesma, F., de Ruiz Holgado, A.P., de Torres, R.A., Coto, C.E., 1999. Antiviral activity of enterocin CRL35 against herpesviruses. *Int. J. Antimicrob. Agents* 12, 293–299.
- Wang, A., Wang, S., Shen, M., Chen, F., Zou, Z., Ran, X., Cheng, T., Su, Y., Wang, J., 2009. High level expression and purification of bioactive human alpha-defensin 5 mature peptide in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, 877–884.
- Wang, Y., Henz, M.E., Gallagher, N.L., Chai, S., Gibbs, A.C., Yan, L.Z., Stiles, M.E., Wishart, D.S., Vederas, J.C., 1999. Solution structure of carnobacteriocin B2 and implications for structure-activity relationships among type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry* 38, 15438–15447.

- Wang, X.J., Wang, X.M., Teng, D., Zhang, Y., Mao, R.Y., Wang, J.H., 2014. Recombinant production of the antimicrobial peptide NZ17074 in *Pichia pastoris* using SUMO3 as a fusion partner. *Lett. Appl. Microbiol.* 59, 71–78.
- Wang, Y., Hong, J., Liu, X., Yang, H., Liu, R., Wu, J., Wang, A., Lin, D., Lai, R., 2008. Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics. *PLoS ONE* 3, e3217.
- Wang, Y., Henz, M.E., Gallagher, N.L., Chai, S., Gibbs, A.C., Yan, L.Z., Stiles, M.E., Wishart, D.S., Vederas, J.C., 1999. Solution structure of carnobacteriocin B2 and implications for structure-activity relationships among type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry* 38, 15438–15447.
- Wang, Y., Sheng, H.-F., He, Y., Wu, J.-Y., Jiang, Y.-X., Tam, N.F.-Y., Zhou, H.-W., 2012. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of Illumina tags. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8264–8271.
- Wang, Z., Wang, G., 2004. APD: the antimicrobial peptide database. *Nucleic Acids Res.* 32, D590–592.
- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10, 57–63..
- Ward, N.J., Buckley, S.M.K., Waddington, S.N., Vandendriessche, T., Chuah, M.K.L., Nathwani, A.C., McIntosh, J., Tuddenham, E.G.D., Kinnon, C., Thrasher, A.J., McVey, J.H., 2011. Codon optimization of human factor VIII cDNAs leads to high-level expression. *Blood* 117, 798–807.
- Waterham, H.R., Digan, M.E., Koutz, P.J., Lair, S.V., Cregg, J.M., 1997. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* 186, 37–44.
- Waters, M.G., Evans, E.A., Blobel, G., 1988. Prepro-alpha-factor has a cleavable signal sequence. *J. Biol. Chem.* 263, 6209–6214.
- Waugh, D.S., 2005. Making the most of affinity tags. *Trends Biotechnol.* 23, 316–320.
- Weber-Lehmann, J., Schilling, E., Gradl, G., Richter, D.C., Wiehler, J., Rolf, B., 2014. Finding the needle in the haystack: differentiating “identical” twins in paternity testing and forensics by ultra-deep next generation sequencing. *Forensic Sci. Int. Genet.* 9, 42–46.
- Weimer, B.C., 2007. Improving the flavour of cheese. Elsevier. 1<sup>st</sup> Edition from BC Weimer. ISBN-9781845690076.
- Weinacker, D., Rabert, C., Zepeda, A.B., Figueroa, C.A., Pessoa, A., Fariás, J.G., 2014. Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. *Braz. J. Microbiol.* 44, 1043–1048.
- Werten, M.W.T., de Wolf, F.A., 2005. Reduced proteolysis of secreted gelatin and Yps1-mediated alpha-factor leader processing in a *Pichia pastoris* kex2 disruptant. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2310–2317.
- Wescombe, P.A., Upton, M., Dierksen, K.P., Ragland, N.L., Sivabalan, S., Wirawan, R.E., Inglis, M.A., Moore, C.J., Walker, G.V., Chilcott, C.N., Jenkinson, H.F., Tagg, J.R., 2006. Production of the Lantibiotic salivaricin A and its variants by oral *Streptococci* and use of a specific induction assay to detect their presence in human saliva. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1459–1466.
- WHO, 2014. WHO | Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014.
- Willems, R.J.L., Top, J., van Santen, M., Robinson, D.A., Coque, T.M., Baquero, F.,

- Grundmann, H., Bonten, M.J.M., 2005. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerging Infect. Dis.* 11, 821–828.
- Willems, R.J.L., Top, J., van Schaik, W., Leavis, H., Bonten, M., Sirén, J., Hanage, W.P., Corander, J., 2012. Restricted gene flow among hospital subpopulations of *Enterococcus faecium*. *mBio* 3, e00151–00112.
- Worobo, R.W., Henkel, T., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C., Stiles, M.E., 1994. Characteristics and genetic determinant of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. *Microbiology* 140 ( Pt 3), 517–526.
- Wright, A., Morrison, S.L., 1997. Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering. *Trends Biotechnol.* 15, 26–32.
- Wu, M., Maier, E., Benz, R., Hancock, R.E., 1999. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 38, 7235–7242.
- Wu, Z., Prahl, A., Powell, R., Ericksen, B., Lubkowski, J., Lu, W., 2003. From pro defensins to defensins: synthesis and characterization of human neutrophil pro alpha-defensin-1 and its mature domain. *J. Pept. Res.* 62, 53–62.
- Yamaguchi, S., Huster, D., Waring, A., Lehrer, R.I., Kearney, W., Tack, B.F., Hong, M., 2001. Orientation and dynamics of an antimicrobial peptide in the lipid bilayer by solid-state NMR spectroscopy. *Biophys. J.* 81, 2203–2214.
- Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L.W., Oppenheim, J.J., 2002. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.* 23, 291–296.
- Yang, D., Biragyn, A., Hoover, D.M., Lubkowski, J., Oppenheim, J.J., 2004. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 181–215.
- Yang, L., Harroun, T.A., Weiss, T.M., Ding, L., Huang, H.W., 2001. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.* 81, 1475–1485.
- Yang, S., Kuang, Y., Li, H., Liu, Y., Hui, X., Li, P., Jiang, Z., Zhou, Y., Wang, Y., Xu, A., Li, S., Liu, P., Wu, D., 2013. Enhanced production of recombinant secretory proteins in *Pichia pastoris* by optimizing Kex2 P1' site. *PLoS ONE* 8, e75347.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y., 2015. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods* 12, 7–8.
- Yi, H.-Y., Chowdhury, M., Huang, Y.-D., Yu, X.-Q., 2014. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 5807–5822.
- Yocum, A.K., Chinnaiyan, A.M., 2009. Current affairs in quantitative targeted proteomics: multiple reaction monitoring-mass spectrometry. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 8, 145–157.
- Yoshida, K., Mukai, Y., Niidome, T., Takashi, C., Tokunaga, Y., Hatakeyama, T., Aoyagi, H., 2001. Interaction of pleurocidin and its analogs with phospholipid membrane and their antibacterial activity. *J. Pept. Res.* 57, 119–126.
- Yoshinari, M., Kato, T., Matsuzaka, K., Hayakawa, T., Inoue, T., Oda, Y., Okuda, K., Shimono, M., 2006. Adsorption behavior of antimicrobial peptide histatin 5 on PMMA. *J. Biomed. Mater. Res.* 77B, 47–54.

- Yuan, J., Zweers, J.C., van Dijl, J.M., Dalbey, R.E., 2010. Protein transport across and into cell membranes in bacteria and archaea. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 179–199.
- Yuen, G.J., Ausubel, F.M., 2014. *Enterococcus* infection biology: lessons from invertebrate host models. *J. Microbiol.* 52, 200–210.
- Yu, R., Dong, S., Zhu, Y., Jin, H., Gao, M., Duan, Z., Zheng, Z., Shi, Z., Li, Z., 2010. Effective and stable porcine interferon-alpha production by *Pichia pastoris* fed-batch cultivation with multi-variables clustering and analysis. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 33, 473–483.
- Zanetti, M., Litteri, L., Griffiths, G., Gennaro, R., Romeo, D., 1991. Stimulus-induced maturation of probactenecins, precursors of neutrophil antimicrobial polypeptides. *J. Immunol.* 146, 4295–4300.
- Zanetti, M., Gennaro, R., Romeo, D., 1995. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* 374, 1–5.
- Zanetti, M., 2005. The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals. *Curr. Issues Mol. Biol.* 7, 179–196.
- Zhang, C., He, X., Gu, Y., Zhou, H., Cao, J., Gao, Q., 2014. Recombinant scorpine produced using SUMO fusion partner in *Escherichia coli* has the activities against clinically isolated bacteria and inhibits the *Plasmodium falciparum* parasitemia *in vitro*. *PLoS ONE* 9, e103456.
- Zhang, J., Zhang, S. quan, Wu, X., Chen, Y. qing, Diao, Z. yu, 2006. Expression and characterization of antimicrobial peptide ABP-CM4 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Process Biochem.* 41, 251–256.
- Zhang, J., Yang, Y., Teng, D., Tian, Z., Wang, S., Wang, J., 2011. Expression of plectasin in *Pichia pastoris* and its characterization as a new antimicrobial peptide against *Staphylococcus* and *Streptococcus*. *Protein Expr. Purif.* 78, 189–196.
- Zhang, L., Yu, W., He, T., Yu, J., Caffrey, R.E., Dalmaso, E.A., Fu, S., Pham, T., Mei, J., Ho, J.J., Zhang, W., Lopez, P., Ho, D.D., 2002. Contribution of human alpha-defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. *Science* 298, 995–1000.
- Zhao, P., Cao, G., 2012. Production of bioactive sheep  $\beta$ -defensin-1 in *Pichia pastoris*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39, 11–17.
- Zhao, T., Doyle, M.P., Harmon, B.G., Brown, C.A., Mueller, P.O.E., Parks, A.H., 1998. Reduction of carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 36, 641–647.
- Zucht, H.D., Raida, M., Adermann, K., Mägert, H.J., Forssmann, W.G., 1995. Casocidin-I: a casein-alpha s2 derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Lett.* 372, 185–188.

## APÉNDICE

---



## APÉNDICE 1. LISTADO DE ABREVIATURAS

### 1. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS GENERALES

$\alpha$ MF	del inglés <i><math>\alpha</math> Mating Factor</i>
$\Delta\Psi$	Potencial de Membrana
$\Delta$ pH	gradiente de pH
$A_{254}$	Absorbancia a 254 nm
aa	Aminoácido
ABC	Transportador del tipo ABC (del inglés <i>ATP Binding Cassette</i> )
ABTS	2,2'-azino-bis[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid]
AcdA	Acidocina A
AcdB	Acidocina B
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADP	del inglés, <i>Adenosin Diphosphate</i>
ADT	del inglés, <i>Agar Diffusion Test</i>
Agg	Proteína de agregación (del inglés <i>Aggregation Substance</i> )
AG	Aparato de Golgi
Aml	Amoxicilina
Amp	Ampicilina
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
ARNt	ARN transferente
ATCC	Del inglés <i>American Type Culture Collection</i>
ATP	del inglés Adenosine Triphosphate
BAL	Bacterias Ácido-Lácticas
BacE50-52	Bacteriocina E 50-52
BHI	del inglés <i>Brain Heart Infusion</i> (medio de cultivo)
BLAST	Del inglés, <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMMY	Medio de cultivo complejo para <i>Pichia pastoris</i>
CbnA	Carnobacteriocina A
CbnB2	Carnobacteriocina B2
CclA	Carnociclina A
CD	Dicroísmo circular (del inglés <i>Circular Dichroism</i> )
CDW	del inglés <i>Cell Dry Weight</i>
Cm	del inglés <i>Chloramphenicol</i>
CMI/MIC	Concentración Mínima Inhibidora (del inglés <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> )
ColV	Colicina V
CurA	Curvacina A
Cyl	Citolisina



Da	Clindamicina
DO <sub>x</sub> /OD <sub>x</sub>	Densidad óptica o absorbancia a una longitud de onda “x”
EfaAfs	Adhesina de la pared celular de <i>Enterococcus faecalis</i>
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (del inglés, <i>European Food Safety Authority</i> )
EnI	Enterolisina
DF	del inglés <i>Dimeric Form</i>
Dha	Deshidroalanina
Dhb	Deshidrobutirina
DSB	del inglés <i>Disulfide Bond</i>
DTS	del inglés <i>Dedicated Transport System</i>
DvnA	divergicina A
DvnV41	Divergicina V41
DvnM35	Divergicina M35
ED	Enlace Disulfuro
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Em	del inglés <i>Erythromycin</i>
EntA	Enterocina A
EntB	Enterocina B
EntJS	Enterocina JS
EntL50	Enterocina L50
EntP	Enterocina P
EntQ	Enterocina Q
EntSE-K4	Enterocina SE-K4
EntV583	Enterocina V583
EP	Espacio Periplásmico
EPM	Ensayo en Placas Microtituladoras
ER	del inglés <i>Endoplasmic Reticulum</i>
ERIC-PCR	Secuencias consenso repetitivas intergénicas de enterobacterias-PCR (del inglés <i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR</i> )
EnI	Proteína extracelular superficial (del inglés <i>Extracellular Surface Protein</i> )
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (del inglés <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> )
FDA	Administración de medicamentos y alimentos americana (del inglés <i>Food and Drug Administration</i> )
FEEDAP	Del inglés <i>Panel on Additives and Products or Substances used in Animal</i>
FPLC	del inglés <i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
FtsY	Receptor del SRP
GG	Doble glicina
GarML	Garvicina ML
GeI	del inglés <i>Gelatinase</i>
GI	Gastrointestinal

GM17	Medio M17 con glucosa
G+C	Contenido de bases guanina y citosina (mol%)
GRAS	del inglés <i>Generally Recognized as Safe</i>
GSP	del inglés <i>General Secretory Pathway</i>
GTP	del inglés Guanine Triphosphate
HirJM79	Hiracina JM7
HPK	del inglés Histidine Protein Kinase
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés <i>High Pressure Liquid Chromatography</i> )
Hyl	Hipotética glicosil hidrolasa (anteriormente hialuronidasa)
IP	del inglés <i>Induction Peptide</i>
IL-2	Interleuquina-2 (del inglés Interleukin-2)
IF	del inglés Induction Factor
K	Kanamicina
KAA	Medio de cultivo KAA (del inglés Kanamycin Aesculin Azide)
LAB	del inglés Lactic Acid Bacteria
LacF	Lactacina F
Lan	Lantionina
LB	Luria-Bertany (medio de cultivo)
LcnA	Lactococina A
Lcn972	Lactococina 972
LDH	Lactato deshidrogenasa (del inglés lactate dehydrogenase)
LMG	del inglés Laboratory of Microbiology Gent Bacteria Collection
LS	del inglés <i>Leader Sequence</i>
MALDI-TOF	del inglés <i>Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight</i>
MALDI-TOF/TOF	Espectrometría de masas en tándem
Man-PTS	del inglés <i>Mannose-Phosphotransferase System</i>
Mcc	Microcina
MCS	del inglés <i>Multiple Cloning Site</i>
MDR	del inglés <i>Multidrug Resistance</i>
ME	Membrana Externa
MPA	del inglés <i>Microtiter Plate Assay</i>
MRM	del inglés <i>Multiple Reaction monitoring</i>
MRS	de Man, Rogosa y Sharpe (medio de cultivo)
MS	del inglés <i>Mass Spectrometry</i>
NBD	del inglés <i>Nucleotide-binding Domain</i>
NBS	del inglés <i>Nucleotide-Binding Sites</i>
NCI-ELISA	del inglés <i>Non-Competitive Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Nis	Nisina
NMR	del inglés <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
ORF	del inglés <i>Open Reading Frame</i>

P61	Piscicolina P61
PA	Proteína Accesoría
PCR	del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PedA-1	Pediocina PA-1
pI	Punto isoelectrico
Pln423	Plantaricina 423
PMF	del inglés <i>Proton Motive Force</i>
PS	Péptido señal
p/v	peso / volumen
QPS	del inglés <i>Qualified Presumption of Safety</i>
RBS	del inglés <i>Ribosome Binding Site</i>
RP	del inglés <i>Reverse Phase</i>
RR	del inglés <i>Response Regulator</i>
SakA	Sakacina A
SakP	Sakacina P
SDS-PAGE	del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SL	Secuencia líder
SOAT	ISP o técnica de inhibición por siembra en picadura (del inglés <i>Stab-On-Agar Test</i> )
SOD	Superóxido dismutasa
SP	del inglés <i>Signal Peptide</i>
SRP	del inglés <i>Signal Recognition Particle</i>
TFA	del inglés <i>Trifluoroacetic Acid</i>
TFE	Trifluoroetanol
TMD	del inglés <i>Transmembrane Domain</i>
TMS	del inglés <i>Transmembrane Segment</i>
TSA	Medio de cultivo TSA (del inglés <i>Tryptic Soya Agar</i> )
TSB	Tryptone Soya Broth (medio de cultivo)
Usp45	del inglés <i>Unknown Secreted Protein of 45 kDa</i>
VRE	Enterococos resistentes a la vancomicina (del inglés <i>Vancomycin Resistant Enterococci</i> )
Wt/vol	del inglés <i>weight/volume</i>
YCB	del inglés <i>Yeast Carbon Base</i>
YMM	del inglés <i>Yeast Minimal Medium</i>
YNB	del inglés <i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	del inglés <i>Yeast extract Peptone Dextrose</i>
OMS/ WHO	Organización Mundial de la Salud (del inglés <i>World Health Organization</i> )
Zeo	del inglés <i>Zeocin</i>

## 2. ABREVIATURAS DE UNIDADES

<b>BU/UB</b>	Unidad de bacteriocina, del inglés <i>Bacteriocin Unit</i>
<b>Da</b>	Dalton
<b>kb</b>	Kilobase
<b>kg</b>	Kilogramo
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>l/L</b>	Litros
<b>ml/mL</b>	Mililitro
<b>μl/μL</b>	Microlitro
<b>mg</b>	Miligramos
<b>ng</b>	Nanogramos
<b>pb/bp</b>	Pares de bases/ <i>Base pairs</i>
<b>ufc/cfu</b>	Unidad formadora de colonia/ <i>Colony forming unit</i>

## 3. ABREVIATURAS DE GÉNEROS MICROBIANOS

<b>A.</b>	<i>Aeromonas</i> spp.
<b>B.</b>	<i>Bacillus</i> spp.
<b>C.</b>	<i>Campylobacter</i> spp.
<b>Cl.</b>	<i>Clostridium</i> spp.
<b>E.</b>	<i>Enterococcus</i> spp. (en ocasiones se refiere a <i>Escherichia</i> spp., por ej.: <i>E. coli</i> )
<b>Lb.</b>	<i>Lactobacillus</i> spp.
<b>Lc.</b>	<i>Leuconostoc</i> spp.
<b>L.</b>	<i>Listeria</i> spp. (en ocasiones se refiere a <i>Lactococcus</i> spp., por ej. : <i>L. lactis</i> )
<b>P.</b>	<i>Pichia</i> spp. (en ocasiones se refiere a <i>Pediococcus</i> spp., por ej. : <i>P. damnosus</i> )
<b>Ps.</b>	<i>Pseudomonas</i> spp.
<b>S.</b>	<i>Saccharomyces</i> spp.
<b>St.</b>	<i>Staphylococcus</i> spp.
<b>Y.</b>	<i>Yersinia</i> spp.

## 4. ABREVIATURAS DE NUCLEÓTIDOS

<b>A (AMP)</b>	Adenina monofosfato o ácido adenílico
<b>C (CMP)</b>	Citosina monofostato o ácido citidílico
<b>G (GMP)</b>	Guanosina monofosfato o ácido guanidílico
<b>T (TMP)</b>	Timidina monofosfato o ácido timidílico
<b>U (UMP)</b>	Uridina monofosfato o ácido uridílico

## 5. ABREVIATURAS Y MASA MOLECULAR DE AMINOÁCIDOS

Aminoácidos	Abreviaturas		Masa molecular (Da)
No modificados postraducionalmente			
Ácido aspártico	Asp	D	133
Ácido glutámico	Glu	E	147
Alanina	Ala	A	89
Arginina	Arg	R	174
Asparagina	Asn	N	132
Cisteína	Cys	C	121
Fenilalanina	Phe	F	165
Glicina	Gly	G	75
Glutamina	Gln	Q	146
Histidina	His	H	155
Isoleucina	Ile	I	131
Leucina	Leu	L	131
Lisina	Lys	K	146
Metionina	Met	M	149
Prolina	Pro	P	115
Serina	Ser	S	105
Tirosina	Tyr	Y	181
Treonina	Thr	T	119
Triptófano	Trp	W	204
Valina	Val	V	117
Modificados postraducionalmente			
Dehidroalanina	Dha	-	
Dehidrobutirina	Dhb	-	
Lantionina	Lan	-	
β-metil-lantionina	MeLan	-	

## APÉNDICE 2. CÓDIGO GENÉTICO

		U	C	A	G	
Primera posición (extremo 5')	U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	U
		UUC }	UCC }	UAC }	UGC }	C
		UUA } Leu	UCA }	UAA *	UGA *	A
		UUG }	UCG }	UAG *	UGG } Trp	G
	C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U
		CUC }	CCC }	CAC }	CGC }	C
		CUA }	CCA }	CAA } Gln	CGA }	A
		CUG }	CCG }	CAG }	CGG }	G
	A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U
		AUC }	ACC }	AAC }	AGC }	C
		AUA }	ACA }	AAA } Lys	AGA } Arg	A
		AUG } Met	ACG }	AAG }	AGG }	G
	G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U
		GUC }	GCC }	GAC }	GGC }	C
		GUA }	GCA }	GAA } Glu	GGA }	A
		GUG }	GCG }	GAG }	GGG }	G

\*Los codones de terminación de la traducción se indican con un asterisco.

## APÉNDICE 3. LISTADO DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y SECUENCIAS DIANA ESPECÍFICAS

Enzima	Secuencia diana <sup>a</sup>
<i>NotI</i>	5'...GC↓GGCCGC...3' 3'...CGCCGG↑CG...5'
<i>XhoI</i>	5'...C↓TCGAG...3' 3'...GAGCT↑C...5'
<i>SacI</i>	5'...GAGCT↓C...3' 3'...C↑TCGAG...5'
<i>BsaI</i>	5'...GGTCTC(N) <sub>1</sub> ↓...3' 3'...CCAGAG(N) <sub>5</sub> ↑...5'
<i>XbaI</i>	5'...T↓CTAGA...3' 3'...AGAT↑CT...5'
<i>BsmBI</i>	5'...CGTCTC(N) <sub>1</sub> ↓...3' 3'...GCAGAG(N) <sub>5</sub> ↑...5'

<sup>a</sup>El sitio de restricción se indica con el símbolo ↓.

## APÉNDICE 4. LISTADO DE TABLAS

**Capítulo II**

<b>Tabla II.1</b>	Bacterias lácticas con estatus QPS.....	22
<b>Tabla II.2</b>	Especies conocidas del género <i>Enterococcus</i> .....	24
<b>Tabla II.3</b>	Principales diferencias entre las bacteriocinas y los antibióticos.....	27
<b>Tabla II.4</b>	Promotores más usados para la expresión heteróloga en <i>P. pastoris</i> .....	54
<b>Tabla II.5</b>	Algunos de los vectores utilizados en <i>P. pastoris</i> .....	55
<b>Tabla II.6</b>	Producción heteróloga de PAMs eucariotas por <i>P. pastoris</i> .....	63
<b>Tabla II.7</b>	Resumen de técnicas NGS.....	68

**Capítulo III / Chapter III**

<b>Table 1</b>	<i>Most indicator species and specific bacterial growth conditions used in this study</i> .....	96
<b>Table 2</b>	<i>Antimicrobial activity of supernatants from selected E. faecalis isolates</i> .....	97
<b>Table 3</b>	<i>Antimicrobial activity of supernatants from isolated E. faecium and other lactic acid bacteria (LAB)</i> .....	98
<b>Table 4</b>	<i>Antimicrobial activity of supernatants from selected LAB against Listeria spp</i> .....	99
<b>Table 5</b>	<i>PCR amplification of bacteriocin structural genes from selected bacteriocinogenic lactic acid bacteria (LAB) isolates</i> .....	100
<b>Table 6</b>	<i>PCR amplification of genes related to potential virulence in E. faecalis</i> .....	101
<b>Table 7</b>	<i>Antimicrobial activity of chromatographically purified enterocin HF and enterocin A produced by E. faecium M3K31 and E. faecium T136</i> .....	102
<b>Table 1S</b>	<i>Primers and PCR conditions for bacteriocin amplification used in this study</i> .....	111

**Capítulo IV / Chapter IV**

<b>Table 1</b>	<i>Bacterial strains and plasmids used in this study</i> .....	118
<b>Table 2</b>	<i>Primers and PCR products used in this study</i> .....	119
<b>Table 3</b>	<i>Amino acid sequence of cloned bacteriocins and other class IIa bacteriocins</i> ....	122
<b>Table 4</b>	<i>Antimicrobial activity of fractions generated during purification</i> .....	122
<b>Table 5</b>	<i>Results obtained by MALDI-TOF/TOF MS analysis of the eluted RP-FPLC fractions</i> .....	123

**Capítulo V / Chapter V**

<b>Table 1</b>	<i>Structure calculation statistics for enterocin HF</i> .....	133
<b>Table 2</b>	<i>Sequence alignment of class IIa bacteriocins with known 3D solution structure</i> .....	134
<b>Table S1</b>	<i>Enterocin HF chemical shifts</i> .....	140

**Capítulo VII / Chapter VII**

<b>Table 1</b>	<i>Amino acid and nucleotide sequence sequence of the native, hybrid and bacteriocin-derived chimeras included in this study</i> .....	152
<b>Table 2</b>	<i>Plasmids used in this study</i> .....	155
<b>Table 3</b>	<i>Primers and PCR products used in this study</i> .....	159
<b>Table 4</b>	<i>Growth and antimicrobial activity<sup>b</sup> of supernatants from recombinant P. pastoris X-33 derivatives, encoding bacteriocin-derived chimeras</i> .....	168

<b>Table 5</b>	<i>Antimicrobial activity of eluted fractions from purified supernatants of recombinant <i>P. pastoris</i> X-33 derived strains</i> .....	169
<b>Table 6</b>	<i>Peptide fragments identified by MRM-ESI-LC-MS/MS (QTRAP), in purified supernatants from recombinant <i>P. pastoris</i> X-33</i> .....	171
<b>Table 7</b>	<i>Antimicrobial activity<sup>a</sup> of purified EntP::EntHF chimera produced by recombinant <i>P. pastoris</i> X-33 and the chemically synthesized EntP::EntHF<sub>synth</sub> against <i>Listeria</i> spp</i> .....	175

## Capítulo VIII / Chapter VIII

<b>Table 1</b>	<i>Amino acid sequence of native antimicrobial peptides (AMPs), hybrid peptides and bacteriocin-AMPs-derived chimeras included in this study</i> .....	190
<b>Table 2</b>	<i>Plasmids used in this study</i> .....	192
<b>Table 3</b>	<i>Primers and PCR products used in this work</i> .....	195
<b>Table 4</b>	<i>Antimicrobial activity<sup>a</sup> of eluted fractions from purified supernatants of <i>P. pastoris</i> X-33 derivatives encoding native antimicrobial peptides (AMPs) and hybrid peptides</i> .....	200

## Capítulo XI / Chapter XI

<b>Table 1</b>	<i>Concentration and molar percentage of SCFAs in human fecal samples after treatment with milk-derived fermented hydrolysates and synthetic antihypertensive peptides</i> .....	227
----------------	--	-----

## APÉNDICE 5. LISTADO DE FIGURAS

### Capítulo II

<b>Figura 2.1</b>	Esquema de la fermentación láctica.....	19
<b>Figura 2.2</b>	Mecanismo de acción de las microcinas.....	29
<b>Figura 2.3</b>	Clasificación de las bacteriocinas.....	32
<b>Figura 2.4</b>	Alineamiento de bacteriocinas de la clase IIa.....	33
<b>Figura 2.5</b>	Estructura tridimensional de algunas bacteriocinas de la subclase IIa.....	34
<b>Figura 2.6</b>	Esquema general de las agrupaciones génicas que codifican las bacteriocinas de la clase II.....	36
<b>Figura 2.7</b>	Representación esquemática de un sistema de secreción ABC clásico en bacterias Gram-positivas (A) y Gram-negativas (B).....	38
<b>Figura 2.8</b>	Transporte y procesamiento de proteínas mediante la ruta Sec.....	39
<b>Figura 2.9</b>	Receptores implicados en el mecanismo de acción de las bacteriocinas de las bacterias lácticas.....	40
<b>Figura 2.10</b>	Principales modelos propuestos para la formación de poros por las bacteriocinas en las membranas de las bacterias sensibles.....	41
<b>Figura 2.11</b>	Vector de expresión proteica pPICZα.....	55
<b>Figura 2.12</b>	Recombinación doble en <i>P. pastoris</i> .....	57
<b>Figura 2.13</b>	Metanolismo del metanol en <i>P. pastoris</i> .....	58
<b>Figura 2.14</b>	Esquema del funcionamiento de plataforma NGS Illumina.....	64
<b>Figura 2.15</b>	<i>Gyps fulvus</i> subespecie <i>fulvus</i> .....	65
<b>Figura 2.16</b>	Funcionamiento de la plataforma NGS Illumina.....	69



**Capítulo III / Chapter III**

<b>Figure 1</b>	Dendrogram of ERIC-PCR showing the relatedness amongst the <i>E. faecalis</i> (A) and <i>E. faecium</i> (B).....	104
<b>Figure 2</b>	MALDI-TOF MS analysis of purified bacteriocins from <i>E. faecium</i> MIM10 (A) and <i>E. faecium</i> M3K31 (B).....	106
<b>Figure 1S</b>	Comparative eBURST analysis against whole MLST from <i>E. faecalis</i> (A) and <i>E. faecium</i> (B).....	108

**Capítulo IV / Chapter IV**

<b>Figure 1</b>	Mass spectrometry analysis of purified supernatants.....	121
-----------------	--	-----

**Capítulo V / Chapter V**

<b>Figure 1</b>	CD spectra of enterocin HF in various concentrations of TFE.....	132
<b>Figure 2</b>	Solution structure of enterocin HF.....	133
<b>Figure 3</b>	Overlay of the alpha-helical region of the 20 structures calculated by CYANA.....	134
<b>Figure S2</b>	Ramachandran plot for enterocin HF generated by CYANA 2.1.....	141
<b>Figure S3</b>	TOCSY and NOESY fingerprint of enterocin HF NMR spectra.....	142
<b>Figure S4</b>	Backbone variability of the beta-sheet domain of enterocin HF.....	142

**Capítulo VII / Chapter VII**

<b>Figure 1</b>	Antimicrobial activity of cell free supernatants of <i>P. pastoris</i> X-33EntA (1), <i>P. pastoris</i> X-33EntA::EntHF (2), <i>P. pastoris</i> X-33EntA::CRL35 (3), <i>P. pastoris</i> X-33EntP (4), <i>P. pastoris</i> X-33EntP::EntHF (5), and <i>P. pastoris</i> X-33EntP::CRL35 (6) against <i>P. damnosus</i> CECT4797 as the indicator microorganism, by using an agar diffusion test (ADT).....	167
<b>Figure 2</b>	Immuno dot-blot of concentrated supernatants from <i>P. pastoris</i> X-33, <i>P. pastoris</i> X-33hSUMO3, <i>P. pastoris</i> X-33hSUMO3-EntHF and <i>P. pastoris</i> X33hSUMO3-EntCRL35, grown in BMMY buffered methanol medium for 0, 24, 48, 72 and 96 h. Numbers (1 to 20) indicate where samples were spotted.....	167
<b>Figure 3</b>	Predicted three-dimensional (3D) structures of native, hybrid and bacteriocin-derived chimeras constructed in this study. C-score is a confidence score for estimating the quality of predicted models. The solution structure of EntHF was determined in a previous study (Arbulu et al., 2015). The N- and C-termini are indicated with N and C, respectively, and regions shaded in light blue indicates the position of the tri-Gly linker.....	173

**Capítulo VIII / Chapter VIII**

<b>Figure 1</b>	Antimicrobial activity of recombinant <i>P. pastoris</i> X-33EntA::HBD-3 by a streak-on agar test (SOAT), during growth in BMMY buffered methanol complex medium. Active colonies are circled in blue.....	199
<b>Figure 2</b>	MALDI-TOF MS analysis of purified supernatants from <i>P. pastoris</i> X-33EntA::L::MccV (A), <i>P. pastoris</i> X-33EntA::L::HBD-3 (B), <i>P. pastoris</i> X-33EntA::L::dCATH-2 (C) and <i>P. pastoris</i> X-33EntA::L::PleWF (D), eluted after RP-FPLC. Numbers indicate the molecular mass in daltons of most of the observed peptide.....	201

**Capítulo X LHLPLP**

<b>Figure 1</b>	Illumina-indexed PRK primers used in this study.....	219
-----------------	--	-----

<b>Figure 2</b>	<i>Changes in human fecal microbial communities during time (A) and after addition of bovine skim milk (BSM)-derived fermented hydrolysates and synthetic antihypertensive peptides (B). Relative abundance of sequences classified to the level of bacterial genera. See legend, with the most abundant genera.....</i>	221
<b>Figure 3</b>	<i>Rarefaction curves showing observed species with respect to sequences per sample between the three time points (A) and treatment of the human samples (B).....</i>	224